

Tesis doctoral

**Caracterización de la glicoproteína CD8 mutante
responsable de la Deficiencia Familiar de CD8.
Estudio de otras inmunodeficiencias que afectan a la
función de los linfocitos T citotóxicos.**

Cecilia P. González Santesteban

Director: Oscar de la Calle Martín

Departamento de Biología Celular,
Fisiología e Inmunología
Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

Barcelona, 2009

Agradecimientos:

Se acerca el final de un largo camino de aprendizaje y perseverancia, sorpresas y contratiempos, alegrías, desilusiones y logros. Al mirar atrás puedo reconocer a todas aquellas personas que me ayudaron a llegar a la meta. A todas ellas quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi director de tesis, Oscar de la Calle, por haberme permitido formar parte del proyecto y por haber supervisado de forma impecable todo el trabajo realizado.

Al equipo de inmunólogos e investigadores de Sant Pau: José Luis Rodríguez, Cándido Juárez, Oscar de la Calle, Carmen Gelpi y Silvia Vidal, gracias por haberme guiado en el mundo de la Inmunología. De ustedes he aprendido mucho, y siempre sentí el apoyo y la confianza necesarios para consultarles cualquier duda, muchísimas gracias.

Laura, gracias por ser mi guía en los primeros tiempos, y por ser mi compañera inseparable durante todo el desarrollo de la tesis. Hemos compartido muchos experimentos, muchas PCRs, muchas transfecciones...gracias.

Queridos compañeros de laboratorio: Ana, Antonia, Bea F. Bea L., Beth, Carlos, Carme, Chiara, Conchita, Consol, Diego, Elena, Eli, Esther, Gema A., Gema B., Herminia, Isabel, Joan, Juan, Laura, Manuela, Mariví, Marta, Mila, Mónica, Nenuca, Rosa, Yolanda. En el transcurso de estos años hemos compartido ideas, seminarios, congresos, aperitivos y cenas, pero también hemos sabido compartir la campana de flujo laminar, el citómetro, centrífugas, termocicladores y pipetas.....quiero agradecer a todos ustedes los buenos momentos que pasamos juntos, la buena voluntad que nos permitió trabajar en equipo y armonía durante todo este tiempo y, sobretodo, la amistad y los consejos que tantas veces me ayudaron a superar los momentos más difíciles.

Quiero sumar a los agradecimientos anteriores a dos personas que son el motor del buen funcionamiento del laboratorio, sobretodo a nivel humano: Meritxell y Teresa, dos secretarias maravillosas.

Bea, gracias por tu amistad y tu sentido del humor, y por enseñarme los primeros pasos del wester blot “artesanal”.

La evolución del wester se la debo a Beth y a Nenu, quienes me revelaron el secreto: los geles comerciales ahorran mucho tiempo y disgustos.

Juan, gracias por la distribución tan perfecta de los pigmentos de melanina (Figura IV.29: Examen microscópico de cabello. A: Individuo normal), pero sobretodo por ser tan buena persona.

No puedo dejar de agradecer a los profesores y ex compañeros de Inmunología del Hospital Clinic, de quienes he aprendido los primeros pasos en la investigación. En particular quiero agradecer a Montse Plana por ayudarme con el marcaje de los tetrámeros, y muy especialmente a Nuria, Virginia y Marta, por la amistad y todos los buenos momentos compartidos.

A mi familia política, les agradezco profundamente todo el soporte y el cariño.

A mis padres y hermanos, tan lejos pero siempre tan presentes, no tengo palabras para expresar mi agradecimiento por haberme apoyado en este proyecto. Los quiero muchísimo, gracias a ustedes los buenos momentos han sido mejores, y los malos, mucho menos dolorosos. Papá, siempre estarás en mi corazón.

Hay amistades que se fortalecen con los años a pesar de la distancia, gracias Vero, por confiar en mí, por tu sinceridad, por tus consejos, gracias amiga.

Por último, quiero agradecer a la persona que más se lo merece, por haberme acompañado todo este tiempo, por haberme apoyado en los momentos difíciles y por haberme tenido tanta paciencia, gracias Miguel, te lo debo todo.

RESUMEN

La Deficiencia Familiar de CD8 está causada por una mutación puntual (Gly111Ser) en la glicoproteína CD8 α que conduce a una ausencia total de la proteína en los linfocitos T y en las células NKs, por lo que proporciona un modelo único para estudiar la función del correceptor CD8 en humanos. Los resultados indican que el correceptor CD8 no sería imprescindible ni para el desarrollo ni para la función efectora de los linfocitos T del linaje citotóxico, aunque el proceso de selección positiva de los linfocitos T restringidos para HLA-I se ve severamente afectado. Puesto que todos los pacientes con Deficiencia Familiar de CD8 pertenecen a la etnia gitana, se investigó la incidencia de la mutación en esta población y en población control (no gitana). La mutación se encuentra restringida a individuos gitanos de la península ibérica, y presenta una frecuencia cromosómica de 1/300. Por otra parte, se analizó el mecanismo por el cual el cambio Gly>Ser conduce a una ausencia total de CD8 en los linfocitos T y en las células NKs de los pacientes. Se diseñaron moléculas quiméricas de las variantes de CD8 α nativa (CD8 α^{Gly}) y mutante (CD8 α^{Ser}) unidas a un péptido marcador para analizar la expresión de CD8 α^{Ser} en la membrana de células transfectadas y para estudiar las características bioquímicas de la molécula mutante. Se demostró que la mutación altera la estructura del dominio inmunoglobulina y la biogénesis de CD8 α^{Ser} (específicamente la capacidad de dimerización, y los procesos de N- y O-glicosilación). La eliminación de la N-glicosilación no conlleva la recuperación de la estructura del dominio *IgV-like* de CD8 α^{Ser} ni un aumento de la forma O-glicosilada de la molécula. Sin embargo, la N-glicosilación tiene un papel fundamental en el mecanismo de control de calidad del retículo endoplásmico, puesto que tras el tratamiento con inhibidores de glicosidasas (bloqueo del mecanismo de control de calidad dependiente de N-carbohidratos) la expresión de CD8 α^{Ser} en su forma madura O-glicosilada aumenta sustancialmente.

Con el fin de profundizar en las diferentes enfermedades genéticas que afectan a las células citotóxicas se analizaron diversas inmunodeficiencias primarias relacionadas. Se estudió un caso de deficiencia de HLA-I, otra inmunodeficiencia primaria que afecta a la etapa de reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T CD8+. Se detectó una mutación en TAP2 no descrita anteriormente en una paciente con una clínica muy similar a la que presentan los pacientes con deficiencia de CD8

(infecciones de repetición del tracto respiratorio). La paciente también presenta úlceras en una pierna, y desarrolla un carcinoma epidermoide sobre dichas lesiones.

También se estudiaron inmunodeficiencias que afectan a los principales mecanismos efectores de los linfocitos T CD8+ y las células NKs: la secreción de gránulos citotóxicos (Síndrome de Griscelli tipo II-SG- y Síndrome de Chediak-Higashi), y la apoptosis mediada por Fas (Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune-ALPS). Se analizó la respuesta inmune en estos pacientes y se realizaron estudios moleculares. Se determinaron los extremos de la delección en el gen *RAB27A*, causante de Síndrome de Griscelli tipo II, y se describieron tres nuevas mutaciones en *FAS*, causantes de ALPS.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. El Sistema Inmune.....	1
2. Ontogenia de los linfocitos T.....	2
2.1 Generación de linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales	4
2.1.1 Decisión de linaje hacia CD4 SP o CD8 SP.....	5
2.1.1.1 Regulación transcripcional de la expresión de los correceptores.....	7
3. Reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T.....	10
4. Respuesta inmune contra virus y tumores: células citotóxicas.....	12
4.1 Los linfocitos T CD8.....	13
4.1.1 La vía endógena de presentación antigénica.	13
4.1.2 Activación de los linfocitos T CD8+ y diferenciación hacia linfocitos T citotóxicos.....	14
4.1.3 Mecanismos efectores de los linfocitos T CD8+	17
4.1.3.1 Citólisis mediante secreción de gránulos de perforina/granzimas	17
4.1.3.2 La vía apoptótica Fas/Fas ligando.....	18
4.1.3.3 Secreción de citocinas	20
4.1.4 Subpoblaciones de linfocitos CD8: Marcadores fenotípicos	20
4.2 Las células <i>Natural Killers</i> (NKs).....	21
4.2.1 Receptores de las células NKs	22
4.2.1.1 Receptores inhibidores	22
4.2.1.2 Receptores activadores	23
4.2.2 Mecanismo de tolerancia de las células NKs.....	24
4.3 Modelos murinos de utilidad en el estudio del eje citotóxico	25
4.3.1.1 Knock outs de CD8.....	25
4.3.1.2 Modelos murinos con deficiencia de MHC de clase I.....	25
4.3.1.3 Modelos de deficiencia del mecanismo de secreción de gránulos citotóxicos	27
4.3.1.4 Modelos de afectación de la vía Fas/FasL	28
5. El correceptor CD8	29
5.1 Estructura	30
5.2 Función de CD8 $\alpha\beta$ y CD8 $\alpha\alpha$	31
5.3 Biogénesis.....	33
6. Inmunodeficiencias primarias.....	36
7. Inmunodeficiencias primarias que afectan el eje citotóxico	39
7.1 Inmunodeficiencias que afectan el reconocimiento antigénico	39
7.1.1 Deficiencia de CD8.....	39
7.1.1.1 Manifestaciones clínicas.....	39
7.1.1.2 Hallazgos de laboratorio.....	40
7.1.1.3 Defecto molecular	40
7.1.1.4 Aspectos funcionales.....	40

7.1.2	Deficiencia de HLA-I (Síndrome del Linfocito Desnudo tipo I)	41
7.1.2.1	Manifestaciones clínicas	41
7.1.2.2	Defectos moleculares	42
7.1.2.3	Aspectos funcionales	43
7.2	Inmunodeficiencias que afectan a la función efectora de los linfocitos citotóxicos	45
7.2.1	Alteraciones de la vía de secreción de gránulos citotóxicos	45
7.2.1.1	Manifestaciones clínicas	46
7.2.1.2	Defectos moleculares	46
7.2.1.3	Aspectos funcionales	47
7.2.1.4	Tratamiento	48
7.2.2	Alteración de la vía Fas/FasL	48
7.2.2.1	Manifestaciones clínicas y criterios diagnósticos	48
7.2.2.2	Hallazgos de laboratorio	49
7.2.2.3	Bases moleculares	49
7.2.2.4	Aspectos funcionales	52
7.2.2.5	Tratamiento	53
II.	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	55
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	59
1.	Muestras biológicas	59
1.1	Muestras de Pacientes	59
1.2	Líneas celulares	59
2.	Técnicas de biología molecular	60
2.1	Extracción de DNA genómico	60
2.2	Extracción de RNA	60
2.3	Síntesis de cDNA	61
2.4	Amplificación de DNA genómico o cDNA por PCR	61
2.5	Secuenciación de un producto de PCR o de un plásmido	64
2.6	Clonaje de un producto de PCR	65
2.6.1	Transformación	66
2.7	Subclonaje	66
2.8	Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	66
2.9	Extracción del plásmido	67
2.9.1	Pequeña escala: Miniprep por lisis alcalina	67
2.9.2	Gran escala: Maxiprep	68
2.10	Digestión con endonucleasas de restricción	68
2.11	Mutagénesis dirigida	69
3.	Construcciones	69
3.1	UCL-CD8 ^{Gly} y UCL-CD8 ^{Ser}	69
3.1.1	UCL1-CD8 N→D	71
3.2	UCL1-Lyt-2 ^{Gly} y UCL1-Lyt-2 ^{Ser}	71
3.3	CD8 ^{Gly} -V5 y CD8 ^{Ser} -V5	71
3.3.1	CD8/V5 N→D	72

3.4	pPXSneo/CD7 ^{Gly} y pXSneo/CD7 ^{Ser}	72
3.5	pCDNA3.1/CD7 ^{Gly} y pCDNA3.1/CD7 ^{Ser}	73
3.6	pCDNA3.1/CD8 β	73
4.	Técnicas de cultivo celular	74
4.1	Transfección transitoria en la línea celular COS7	74
4.2	Cotransfección de CD8 α y CD8 β	74
4.3	Transfección estable del hibridoma murino 9.4CwBw por electroporación	74
4.4	Transfección estable de la línea murina 300.19.....	75
4.5	Inhibición de la N-glicosilación	75
4.6	Modificación del procesamiento de N-carbohidratos	75
5.	Técnicas de citometría de flujo	76
5.1	Inmunofluorescencia directa.....	77
5.2	Inmunofluorescencia indirecta.....	77
5.3	Inmunofluorescencia intracelular directa	77
5.4	Inmunofluorescencia intracelular indirecta	78
5.5	Marcaje con tetrámeros.....	78
5.6	Estudio de las familias V β del TCR.....	79
6.	Estudio bioquímico de proteínas	79
6.1	Extractos celulares.....	79
6.1.1	Digestión con endoglicosidasas.....	79
6.2	Western blot.....	80
7.	Estudio funcional de linfocitos humanos	80
7.1	Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	80
7.2	Separación magnética de subpoblaciones linfocitarias	81
7.3	Cuantificación de los círculos de escisión de los reordenamientos del TCR (TRECs).....	81
7.4	Actividad CTL en respuesta a aloantígenos.....	81
7.5	Actividad CTL dependiente de la vía de secreción de gránulos	82
7.6	Ensayo de actividad NK	83
7.7	Ensayo CD107a	84
7.8	Ensayo de apoptosis inducido por Fas	84
IV.	RESULTADOS	87
1.	Estudio de pacientes con Deficiencia Familiar de CD8	87
1.1	Antecedentes Clínicos e Inmunológicos.....	87
1.2	Descripción de nuevos casos clínicos	88
1.3	Estudio inmunológico de los nuevos casos	89
1.3.1	Inmunidad Humoral.....	89
1.3.2	Estudio de las poblaciones linfocitarias.....	89
1.3.3	Análisis de la expresión de CD8 α y CD8 β por Western Blot.....	90
1.3.4	Estudio del fenotipo de las células CD3+CD4-CD8-.....	91
1.3.5	Análisis del repertorio V β	92

1.3.6	Análisis de la frecuencia de los círculos de escisión de los reordenamientos del TCR (TRECs).....	93
1.3.7	Estudio funcional.....	93
1.3.7.1	Análisis de la capacidad citotóxica.....	93
1.3.7.2	Análisis de la capacidad de generar una respuesta restringida para HLA-I	95
1.3.8	Análisis del gen CD8A.....	96
1.4	Estudio de la incidencia de la mutación 331G>A en la población gitana española y en la población general.....	97
2.	Caracterización molecular de la glicoproteína mutante CD8 α^{Ser}	98
2.1	Diseño de construcciones UCHL/CD8.....	99
2.1.1	Estudio de la expresión de la glicoproteína CD8 α^{Ser}	99
2.1.1.1	Experimentos de transfección transitoria.....	99
2.1.1.2	Experimentos de transfección estable.....	100
2.1.2	Generación de la mutación Gly>Ser en la molécula CD8 α murina (Lyt-2).....	102
2.1.2.1	Análisis de la expresión de Lyt-2 Ser en la superficie celular.....	102
2.1.3	Análisis bioquímico de las construcciones UCHL-CD8 α	103
2.2	Diseño de nuevas construcciones: CD8-V5.....	104
2.2.1	Estudio bioquímico de la molécula CD8 α V5.....	105
2.2.2	Estudio de la presencia del N-carbohidrato: Digestión con endoglicosidasas	106
2.2.3	Eliminación de la diana de N-glicosilación y análisis de la conformación del dominio Ig.....	107
2.2.4	Análisis de la O-glicosilación en CD8 α^{Ser}	109
2.2.5	Análisis de la diferencia en el patrón de O-glicosilación que se observa usando diferentes anticuerpos y/o diferentes construcciones.....	110
2.2.5.1	Análisis de UCHL-CD8 α^{Ser} con diferentes anticuerpos.....	110
2.2.5.2	Análisis de CD8 Ser unida a distintos péptidos marcadores.....	111
2.2.5.3	Análisis del patrón de O-glicosilación tras la eliminación de la diana de N-glicosilación.....	112
2.2.6	Análisis de la capacidad de dimerización de CD8 Ser	114
2.2.6.1	Análisis de la capacidad de homodimerización: Experimentos de western blot en condiciones no reductoras.....	114
2.2.6.2	Análisis de la capacidad de CD8 α^{Ser} para formar heterodímeros con CD8 β : Experimentos de cotransfección.....	115
2.2.7	Análisis del impacto de la mutagénesis Gly>Ser sobre la glicoproteína CD7.	117
2.2.7.1	Transfección transitoria.....	117
2.2.7.2	Transfección estable.....	118
2.2.8	Análisis del tránsito intracelular de CD8 α^{Ser} tras la modificación de los N-carbohidratos.....	119
2.2.9	Estudio de la presencia del motivo G-X-Y-X-C en otras moléculas con dominio IgV-like.....	123
3.	Análisis de otras inmunodeficiencias que afectan a la función de los linfocitos citotóxicos.....	124
3.1	Deficiencia de MHC clase I.....	124
3.1.1	Descripción del caso clínico.....	124
3.1.2	Estudios Inmunológicos.....	126
3.1.2.1	Análisis del fenotipo linfocitario.....	126

3.1.3	Estudio de la expresión de HLA-I en la superficie de los leucocitos.....	126
3.1.4	Análisis molecular de los alelos HLA.....	127
3.1.5	Estudio genético	127
3.2	Alteración en la función citotóxica. Defectos en la vía de secreción de gránulos	130
3.2.1	Descripción de los casos clínicos	130
3.2.1.1	Examen microscópico del cabello y extendidos de sangre periférica.....	131
3.2.1.2	Diagnóstico clínico diferencial.....	131
3.2.2	Estudios inmunológicos.....	132
3.2.2.1	Estudio del fenotipo linfocitario.....	132
3.2.2.2	Estudio de las inmunoglobulinas séricas.....	133
3.2.3	Estudios funcionales	133
3.2.3.1	Actividad NK	134
3.2.3.2	Capacidad de movilización de gránulos citotóxicos de las células NKs.....	134
3.2.3.3	Actividad CTL mediada por liberación de gránulos citotóxicos.....	135
3.2.4	Estudio genético	136
3.3	Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune: ALPS	140
3.3.1	Descripción de los casos clínicos	140
3.3.2	Estudios inmunológicos.....	142
3.3.2.1	Análisis del fenotipo linfocitario.....	142
3.3.2.2	Estudio de los niveles séricos de inmunoglobulinas e IL-10.....	144
3.3.3	Estudios funcionales: análisis de la apoptosis mediada por FAS.....	145
3.3.4	Estudio genético	146
3.3.4.1	Estudio de genes moduladores de ALPS	150
V.	DISCUSIÓN	155
1.	Deficiencia Familiar de CD8	155
1.1	Análisis comparativo de las manifestaciones clínicas	155
1.2	Análisis de la función del correceptor a nivel periférico y a nivel central ..	156
1.3	Estudio de la prevalencia de la mutación en la población general y en la población gitana española.....	158
1.4	Análisis estructural de la molécula mutante CD8 α^{Ser}	159
2.	Otras inmunodeficiencias que afectan al eje de las células citotóxicas.	164
2.1	Deficiencia de HLA-I.....	164
2.2	Alteración en la función citotóxica.	166
2.2.1	Defectos en la vía de secreción de gránulos	166
2.2.2	Defectos en la vía de apoptosis mediada por Fas	167
VI.	CONCLUSIONES	171
	ABREVIATURAS	173
	NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS.....	177
	BIBLIOGRAFÍA.....	179

I. INTRODUCCIÓN

1. El Sistema Inmune

El sistema inmune es el conjunto de células y moléculas que actúan coordinadamente para proteger al organismo de agentes infecciosos y agentes externos nocivos. La primera línea de defensa de la respuesta inmune es la **inmunidad innata**, constituida por todos aquellos mecanismos que existen antes de producirse la infección y que, por lo tanto, proporcionan una respuesta inmediata contra los microorganismos. Los principales componentes de la inmunidad innata son 1) las barreras físicas y químicas (epitelios y sustancias secretadas por las superficies epiteliales), 2) las células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y células natural killers (NK), 3) proteínas del complemento y otros mediadores de la inflamación, y 4) las citocinas, proteínas que regulan la actividad de las células del sistema inmune.

Tras la exposición al agente infeccioso se estimulan mecanismos de defensa más lentos que los de la inmunidad innata pero más sofisticados y altamente específicos, que tienen la particularidad de “recordar” a un microorganismo determinado y de “mejorar” la respuesta frente a una nueva exposición. Debido a esta capacidad de respuesta adaptada a la infección, a este conjunto de mecanismos se los conoce como **inmunidad adaptativa**. Los principales componentes son la inmunidad humoral, que está mediada principalmente por anticuerpos producidos por los linfocitos B, y la inmunidad celular, constituida por los linfocitos T. Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos con una gran especificidad, neutralizando su capacidad de infección y favoreciendo su posterior eliminación por varios mecanismos efectoros. Dentro de los linfocitos T pueden distinguirse distintas subpoblaciones desde el punto de vista funcional. Los linfocitos T colaboradores secretan citocinas que

INTRODUCCIÓN

estimulan la proliferación y diferenciación de otros linfocitos T y otras células como linfocitos B y macrófagos, de forma que son fundamentales para la coordinación de la respuesta inmune. Por otra parte, los linfocitos T citotóxicos son fundamentales para la eliminación de patógenos intracelulares (como virus y algunas bacterias) que son inaccesibles a los anticuerpos. Recientemente se han descrito otras poblaciones de linfocitos T; las células T reguladoras (Treg), las células Th17, y los linfocitos NKT. Otro linaje distinto de los linfocitos T lo conformarían aquellas células que presentan el receptor $\gamma\delta$.

La inmunidad innata y la inmunidad adaptativa actúan de forma integrada, de forma que un gran número de células y moléculas actúan como nexo de unión entre ambas (Abul K. Abbas. "Cellular and Molecular Immunology" 6th Edition).

2. Ontogenia de los linfocitos T

La fuente principal de linfocitos T maduros es el timo, aunque existen evidencias de que algunos linfocitos inmaduros podrían emigrar del timo y poblar el intestino, donde sufrirían una maduración según un proceso de selección *in situ* (Lambolez 2006). Los timocitos inmaduros sufren en el timo una serie compleja de interacciones con células epiteliales y mieloides del estroma y con otros timocitos. La gran diversidad de señales hace que en el timo se formen diferentes tipos de linfocitos T. Entre ellos se encuentran los linfocitos T $\alpha\beta$, principales responsables de la respuesta específica de antígeno y restringida para el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), y los linfocitos T $\delta\gamma$, no restringidos para MHC, que complementan y regulan la actividad de las células $\alpha\beta$, principalmente en los tejidos. Estos dos grupos principales de linfocitos pueden subdividirse, a su vez, en células con diferentes capacidades funcionales (Hayday 2007, Figura I.1).

Las células progenitoras que ingresan al timo (inicialmente del hígado fetal y luego de la médula ósea) representan el 1-2% de los timocitos y son células doble negativas (DN) que no expresan ni el correceptor CD4 ni el correceptor CD8. Las células DN progresan por distintas etapas, desde DN1 hasta DN4. En el estadio DN2 comienza el reordenamiento somático de los genes que codifican para el TCR β , TCR δ y TCR γ , que prácticamente se completa hacia el estadio DN3 (Hayday 2007).

Los **linfocitos T $\gamma\delta$** emergen directamente de timocitos DN. Se ha demostrado que algunos de estos timocitos $\gamma\delta$ (con TCR V γ 5V δ 1 y que más tarde emigran a la

epidermis) sufren selección positiva, aunque a diferencia de la selección positiva $\alpha\beta$ convencional, las moléculas MHC no parecen estar involucradas (Lewis 2006). Otro subgrupo de células $\gamma\delta$ que expresan receptores $V\gamma 6V\delta 1$ emigran al tracto genital, y un tercer grupo coloniza el epitelio del intestino delgado y expresa principalmente receptores $V\gamma 7V\delta 4$.

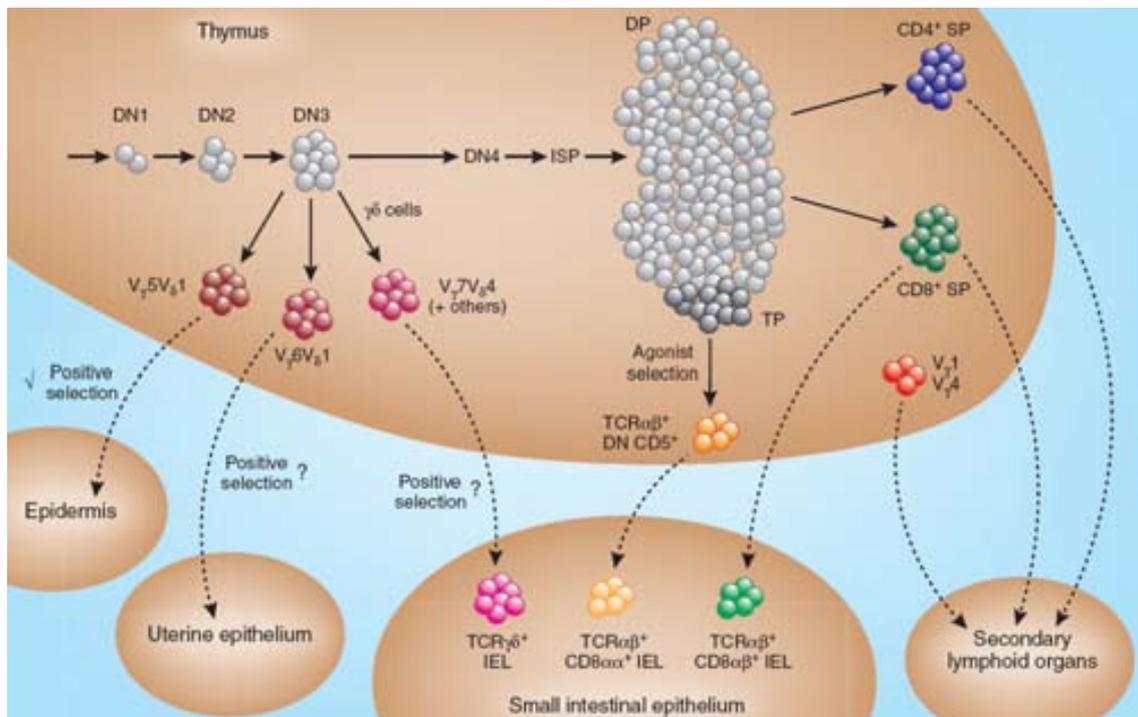


Figura I.1: Estadios de diferenciación de los linfocitos T. En el estadio DN3 diversas oleadas de timocitos se diferencian a células con TCR $\gamma\delta$ que colonizan el epitelio de distintos sitios anatómicos. Una fracción de timocitos DP expresa también CD8 $\alpha\alpha$ (triples positivos, TP) y son los precursores de los linfocitos T $\alpha\beta$ intraepiteliales (IEL). Los timocitos DP se diferencian hacia linfocitos T CD8 y linfocitos T CD4 SP (Hayday 2007).

En el estadio DN4, las células sufren un control del reordenamiento correcto de la cadena β del TCR, que se expresa junto con el polipéptido pre-T α . La señalización del pre-TCR en las células DN no parece depender de ningún ligando externo, sino que el propio receptor se internaliza y dispararía la cascada de señalización, lo que conduciría a la excusión alélica del locus *Tcrb*, a la proliferación celular, y a la expresión de los correceptores, primero CD8 y luego CD4 (Miosge 2007, Yamasaki 2006). Las células en el estadio DP, que representan entre el 75 y el 88% de los timocitos, dejan de proliferar y reexpresan los genes RAG, de forma que son capaces de reordenar el locus *Tcra* y comienzan a expresar el TCR $\alpha\beta$ maduro.

INTRODUCCIÓN

Una fracción de timocitos DP expresa también CD8 $\alpha\alpha$. Estas células triple positivas (TP) pasan por el estadio de timocitos DN tras recibir una señal positiva fuerte (llamada selección agonista para distinguirla de la selección positiva convencional que se discute en el próximo apartado), y más tarde generan los **linfocitos T $\alpha\beta$ intraepiteliales (IEL) CD8 $\alpha\alpha$** (Gangadharan 2006). La mayor parte de estos linfocitos expresan TCRs autorreactivos de alta afinidad. Mas adelante se discute la función de CD8 $\alpha\alpha$ como correpresor, permitiendo que los timocitos TP sobrevivan a la señal agonista sin ser eliminados por selección negativa.

2.1 Generación de linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales

En el grupo mayoritario de células DP, que no expresan CD8 $\alpha\alpha$, el complejo TCR $\alpha\beta$ maduro pasa por un control más riguroso. En la corteza tímica, la falta de unión a ligandos lleva a la muerte por “ignorancia”, mientras que la interacción del TCR con complejos MHC-péptidos propios de las células epiteliales corticales produce el rescate de la muerte por apoptosis o **selección positiva**. Al unirse al mismo complejo MHC-péptido reconocido por el TCR, los correceptores CD4 y CD8 promueven el reclutamiento de p56^{lck} a los dominios citosólicos del TCR y colaboran a generar la señal de la selección positiva que rescata a los linfocitos de la muerte por apoptosis (Veillette 1989). Paralelamente a la selección positiva y dependiendo de si esta interacción se produce con MHC I o MHC II, las células se diferencian hacia células simples positivas (SP) CD8 o CD4, respectivamente, proceso que se denomina **decisión de linaje**. Las células SP que han pasado la selección positiva migran a la médula, donde interaccionan con células epiteliales y células dendríticas medulares especializadas. Si la afinidad del TCR por complejos MHC-péptido propio es muy alta las células mueren por apoptosis. Mediante este proceso de **selección negativa** son eliminadas las células potencialmente autorreactivas en la periferia. En el timo existe una subpoblación de células capaces de expresar una gran cantidad de genes específicos de diversos tejidos bajo el control del gen autosómico AIRE (Anderson 2002). Solo el 4% del total de timocitos logra sobrevivir a los procesos de selección positiva y negativa.

2.1.1 Decisión de linaje hacia CD4 SP o CD8 SP

Como hemos visto, paralelamente a la selección positiva, ocurre el proceso de decisión de linaje hacia células colaboradoras CD4+, en aquellos timocitos con TCR restringido para MHC II, o hacia células citotóxicas CD8+, cuando el TCR está restringido para MHC I. Durante este proceso los timocitos pasan por una serie de estadios intermedios, principalmente CD4⁺CD8^{low} (Figura I.2).

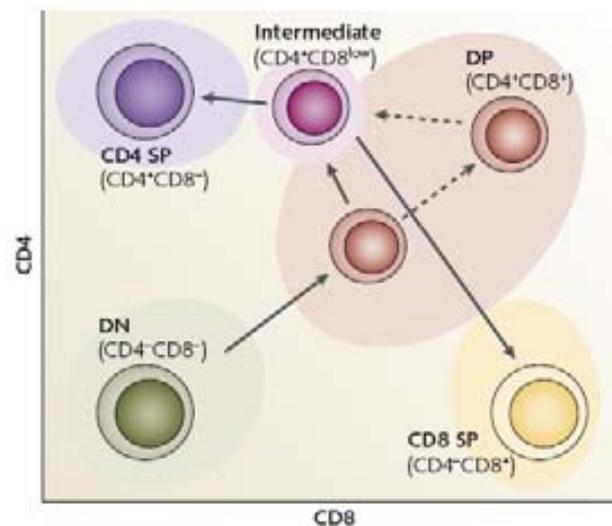


Figura I.2: Subpoblaciones de timocitos durante su diferenciación a linfocitos T $\alpha\beta$ SP (Singer 2008).

Una característica importante de la decisión de linaje, es que existe una correlación casi perfecta entre la restricción MHC clase I o clase II del TCR que expresa un linfocito maduro y la expresión de CD8 o CD4, respectivamente. Se propusieron dos posibles modelos, basados principalmente en la lógica, para intentar explicar esta correlación. El **modelo estocástico-selectivo**, postula que la regulación negativa de uno de los dos correceptores es un proceso aleatorio independiente de la especificidad del TCR, y el proceso selectivo subsecuente elimina a aquellos timocitos que “eligieron” expresar el correceptor inadecuado. Por otra parte, el **modelo instructivo**, sugiere que la regulación negativa del correceptor “incorrecto” está regulada por señales específicas iniciadas por el TCR y el correceptor “correcto” (que se une al MHC para el cual está restringido dicho TCR).

El modelo estocástico-selectivo es incompatible con la alta eficiencia en la generación de linfocitos SP que se generan a partir de timocitos DP capaces de pasar la selección positiva (Itano 2000). Otra observación que se contrapone al modelo

INTRODUCCIÓN

estocástico es que las células $CD4^+CD8^{lo}$ en ratones deficientes en MHC clase II, consideradas según este modelo como “equivocadas en la elección del correceptor”, demostraron ser en realidad intermediarias normales en el linaje hacia linfocitos CD8 (Brugnera 2000, Bosselut 2003). Por otra parte el modelo instructivo, aunque con modificaciones, se fue reforzando con las nuevas líneas de investigación. Se ha sugerido que el correceptor CD4 tiene mayor capacidad de interacción con p56 Lck que el CD8 (Wiest 1993), por ello se propuso un modelo instructivo en el cual la decisión hacia CD4 o CD8 es dependiente, respectivamente, de señales de TCR fuertes o débiles. A este modelo se lo llamó **modelo instructivo cuantitativo**, y más tarde fue reforzado por estudios que muestran que un aumento de la actividad Lck favorece el desarrollo hacia el linaje CD4, mientras que una actividad Lck disminuída favorece el desarrollo hacia CD8 (Hernandez-Hoyos 2000). Sin embargo, cuando se estudió el efecto de la fuerza de la señal en la decisión de linaje manipulando directamente la señalización del TCR se comprobó que la intensidad de la señal influye en la eficiencia del proceso de generación de linfocitos T SP, pero no altera la decisión de linaje (Bosselut 2001, Erman 2006). Por otra parte, varios estudios sostienen que la decisión de linaje dependería más de la **duración de la señal del TCR** que de su fuerza (Yasutomo 2000, Liu 2004). El modelo de la duración de la señal, aunque con algunas modificaciones, sigue siendo un modelo instructivo clásico, y como tal postula que cualquier regulación en la transcripción de los correceptores sería posterior al evento que conduzca a la decisión de linaje. Por lo tanto, este modelo no explica el hecho de que los timocitos intermedios $CD4^+CD8^{low}$ hayan sufrido una regulación negativa en la expresión de CD8 a nivel transcripcional (Bosselut 2003), ni tampoco explica los mecanismos por los cuales la señalización restringida por MHC-II tendría una mayor duración. Un nuevo modelo que parece conciliar ambos puntos es el **modelo de la señalización cinética** (Brugnera 2000), que sostiene que la regulación negativa de CD8 en el estadio $CD4^+CD8^{low}$ acorta específicamente la duración de la señalización del TCR en los timocitos restringidos para clase I (dependientes de la coasociación a CD8) pero no en los restringidos para clase II. Así, el cese de la señal del TCR en timocitos intermedios $CD4^+CD8^{low}$ lleva a su diferenciación hacia CD8 SP, mientras que si la señal persiste, se diferencian hacia CD4 SP. El modelo cinético propone que la persistencia o el cese de la señal regula inversamente la señalización inducida por IL-7 y otras citocinas que se unen a la cadena γ común del receptor de citocinas, de forma que la señalización del receptor de citocinas actuaría como un sensor de la duración de

la señal del TCR (Singer 2008, Brugnera 2000, Singer and Bosselut 2004). El modelo de la señalización cinética se considera como “no clásico”, ya que no es ni estocástico ni instructivo, sino que los timocitos DP están preprogramados para terminar transitoriamente la transcripción de CD8, cualquiera sea su especificidad de TCR, pero esta terminación transcripcional no implica decisión de linaje, ya que los timocitos intermediarios CD4⁺CD8^{low} tienen potencial para diferenciarse hacia cualquiera de los dos linajes (Kappes 2005).

2.1.1.1 Regulación transcripcional de la expresión de los correceptores

La regulación en la expresión de CD4 resulta de la actividad de un elemento silenciador que impide la transcripción del gen *Cd4* en las células del linaje CD8 (Sawada 1994). En cambio, la regulación de la expresión de *Cd8* está mediada por un conjunto de elementos *enhancers* (E8I-E8V) específicos del estadio celular y de las condiciones de activación (Ellmeier 1998, Feik 2005). El *enhancer* E8III solo es activo en los timocitos DP (Feik 2005), mientras que E8I solo es activo en los timocitos CD8 y en los linfocitos T CD8 (Hostert 1997), por lo que parecen ser los elementos determinantes de la regulación de la expresión de Cd8 durante la maduración de los timocitos.

Se han identificado diversos factores de transcripción involucrados en la regulación de los genes *Cd4* y *Cd8*. Algunos actúan como remodeladores de la heterocromatina, como Ikaros (Urban 2004), Mi-2 β (Naito 2007) y el complejo BAF tipo SWI/SNF (Chi 2002), mientras que otros regulan directamente la transcripción de genes efectores. La identificación de estos factores y su mecanismo de acción han permitido avanzar en el conocimiento del proceso de decisión de linaje, y parecen avalar el modelo de señalización cinética. El factor **Th-POK** es fundamental para la decisión de linaje hacia CD4 y para la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ (He 2005, Sun 2005). Es el gen mutado (espontáneamente) en los ratones HD, deficientes en células T *helper* (Dave 1998, Keefe 1999). Asimismo, en los ratones transgénicos para Th-POK todos los timocitos que sufren selección positiva se diferencian a linfocitos T CD4, incluso aquellos timocitos con TCR restringido para MHC-I (He 2005, Sun 2005). Los linfocitos T CD8 maduros también son susceptibles a los efectos inductores del linaje CD4 mediados por Th-POK (Jenkinson 2007), de forma que Th-POK parece ser un regulador “master” tanto para la decisión de linaje como para la diferenciación hacia linfocitos CD4 (Kappes 2006). *Thpok* muestra un patrón de expresión específico de

INTRODUCCIÓN

estadío y linaje y está muy finamente regulado durante el desarrollo tímico. Comienza a expresarse en los timocitos DP $CD4^+CD8^{low}$, y su expresión aumenta considerablemente tras la señalización persistente del TCR (He 2008), concordando con el modelo de señalización cinética, por el cual la persistencia de la señal conduce a la diferenciación hacia el linaje CD4.

Las proteínas **Runx** pertenecen a la familia de factores de transcripción con dominio runt. Tanto RUNX1 como RUNX3 se unen al silenciador de Cd4 y regulan negativamente la expresión de Cd4 (Taniuchi 2002). La expresión de RUNX3 aumenta considerablemente durante la diferenciación de los timocitos DP $CD4^+CD8^{low}$ a timocitos CD8, y es fundamental para dicha diferenciación. No solo inhibe la transcripción de Cd4 al unirse al silenciador, sino que se une al *enhancer* E8I, reiniciando así la transcripción del gen cd8 (Sato 2005). Además, se une a una secuencia del gen que codifica para Th-POK, bloqueando su expresión (Setoguchi 2008).

Otro factor que interviene en la regulación de la expresión génica durante la decisión de linaje es **TOX** (thymus high-mobility Group box protein), modulando la estructura local de la cromatina y reclutando otros factores nucleares (Stros 2007). Los niveles de expresión de TOX aumentan en los timocitos DP tras la señalización del TCR. En los ratones deficientes en TOX, los timocitos que sufren la selección positiva en vez de convertirse en timocitos $CD4^+CD8^{low}$ se convierten en $CD4^{low}CD8^{low}$, y no se produce la diferenciación hacia células CD4+ (Aliahmad 2008). De esta forma TOX parece intervenir en el aumento de la expresión de Cd4 durante la selección positiva de los timocitos DP y durante su diferenciación al linaje CD4.

En la decisión de linaje hacia CD4 también es importante el factor **GATA3**, ya que la expresión continuada de GATA3 en los timocitos DP que reciben la señalización por TCR bloquea la generación de células CD8, y la delección condicional de GATA3 en los timocitos DP produce una disminución del número de timocitos SP CD4 pero no de los timocitos SP CD8 (Pai 2003). A diferencia de Th-POK, GATA3 no es un factor determinante de la decisión de linaje a CD4, ya que la expresión forzada de GATA 3 si bien impide la diferenciación de timocitos hacia células CD8, no redirecciona los timocitos restringidos por MHC-I hacia el linaje CD4.

El proceso de decisión de linaje puede integrarse con los conocimientos actuales sobre los eventos de la señalización del TCR y la elucidación de los factores que regulan la transcripción génica (Figura I.3). La señalización del TCR durante la

selección positiva suprime temporalmente la expresión del gen *Cd8* (mediante la supresión de la actividad del *enhancer* E8III), y aumenta la expresión de *TOX*. Los timocitos se convierten así en células $CD4^+CD8^-$ (con fenotipo $CD4^+CD8^{low}$).

Si la señalización positiva está mediada por TCRs restringidos para MHC-II, dicha señalización persiste en los timocitos $CD4^+CD8^{low}$, y se produce un aumento en la expresión de *GATA3* y *Th-POK*, de forma que se asegura tanto la expresión del gen *Cd4* como la diferenciación hacia el linaje *CD4*. En cambio, si el TCR está restringido para MHC-I, la señalización en los timocitos intermediarios queda interrumpida.

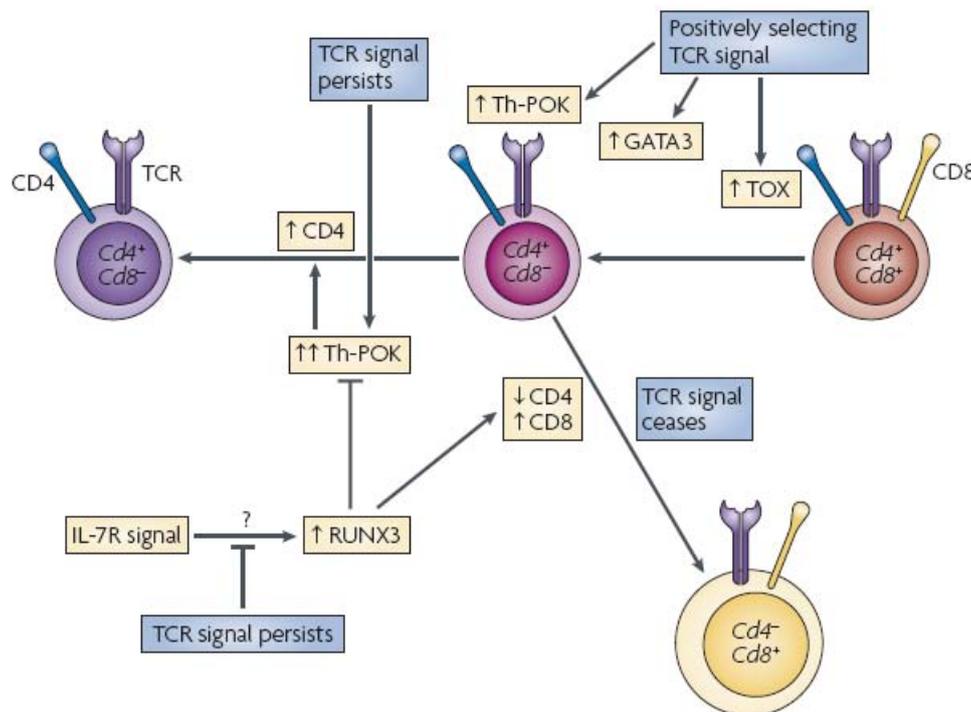


Figura I.3. Esquema de las señales y factores que intervienen en el proceso de decisión de linaje (Singer 2008).

Esta interrupción conduce a la desinhibición de la vía de señalización mediada por la cadena γ y común del receptor de citocinas (principalmente $IL7R$) y, como consecuencia, a un aumento en la expresión de $RUNX3$ (mediante un mecanismo aún no dilucidado). $RUNX3$ silencia los genes de $Th-POK$ y de $CD4$, y a su vez reinicia la expresión de $Cd8$ (mediante la activación del *enhancer* E8I). Así, en presencia de $IL-7$ y otras citocinas, los timocitos restringidos para MHC-I se diferencian al linaje $CD8$ (Singer 2008).

3. Reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T

El proceso de selección tímico conlleva que los linfocitos T únicamente reconozcan el antígeno en el contexto de la **molécula del complejo principal de histocompatibilidad** que ha servido como elemento de restricción durante la selección positiva. Moléculas de clase I (MHC-I) en el caso de los linfocitos T CD8+, o de clase II (MHC-II) en el caso de los linfocitos T CD4+. Las moléculas de clase I se expresan en todas las células nucleadas, mientras que las moléculas de clase II solo se expresan en células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) y en las células epiteliales del timo. Ambos tipos de moléculas son heterodímeros y se componen de tres dominios extracelulares: un superdominio de unión al antígeno y dos dominios tipo inmunoglobulina. La estructura global del sitio de unión al péptido (Figura I.4) es muy similar en las moléculas de MHC-I y MHC-II: una “base” compuesta por 7 láminas β y dos “márgenes” formados por estructuras hélice α , a pesar de que los componentes que se asocian para formar la estructura son distintos (Rudolph 2006).

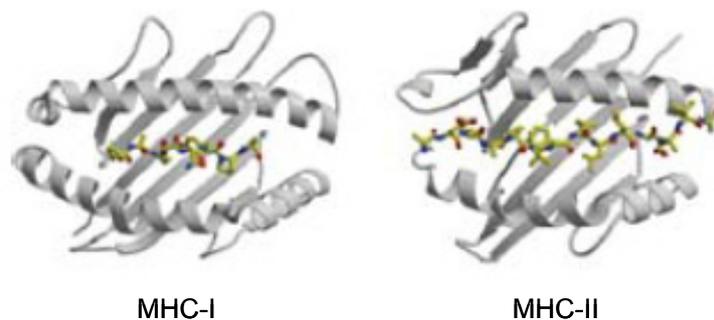


Figura I.4: Esquema del sitio de unión al péptido en las moléculas MHC (Abul K. Abbas. 6th Edition).

En las moléculas de clase I el sitio de unión al péptido ($\alpha_1\alpha_2$) se compone exclusivamente por la cadena pesada α , mientras que la cadena liviana β_2 .microglobulina se asocia al dominio α_3 . En las moléculas de clase II el superdominio de unión al péptido ($\alpha_1\beta_1$) se compone de la asociación de ambas cadenas α y β . Las moléculas MHC-I generalmente unen péptidos de una longitud de 8-10 residuos en una conformación extendida, donde los residuos terminales adoptan una conformación fija en bolsillos específicos de cada alelo MHC-I (Madden 1993), de forma que las cadenas laterales aminoacídicas quedan colocadas hacia arriba, lo que

les permite interactuar directamente con el TCR. En las moléculas MHC de clase II, el bolsillo está abierto por ambas partes, y los péptidos no suelen estar unidos en sus extremos, de forma que generalmente las moléculas de clase II unen péptidos más largos que las moléculas de clase I (entre 12 y 22 residuos, Stern 1994).

Dentro del complejo MHC/HLA (HLA en humanos, de antígenos leucocitarios humanos), consideramos tres loci principales de clase I (HLA-A, B y C) y tres de clase II (HLA-DP, DQ y DR), que se expresan de forma codominante. Dichos genes son extremadamente polimórficos, y dicha variabilidad se concentra en los sitios de unión al péptido.

Cada clon de linfocitos T expresa en su superficie un **receptor de antígeno o TCR** (Receptor del linfocito T) con una estructura única. Son heterodímeros de cadenas α y β o de cadenas γ y δ . Cada cadena se compone de un dominio inmunoglobulina tipo variable, un dominio inmunoglobulina tipo constante, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático muy corto. Los TCRs $\alpha\beta$ reconocen péptidos unidos a las moléculas de MHC con una especificidad muy elevada pero con una afinidad relativamente baja. Por lo que respecta a los TCRs $\gamma\delta$ sus ligandos no están bien caracterizados. El contacto de los TCRs $\alpha\beta$ con el péptido se produce principalmente a través de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) presentes en los dominios hipervariables 3 (CDR3 α y CDR3 β), mientras que los contactos con las zonas conservadas de las hélices α de las moléculas MHC se realizan sobre todo a través de CDR1 y CDR2 (Figura 1.5). El TCR se asocia físicamente con las cadenas γ , δ , ϵ del CD3 y el homodímero $\zeta\zeta$ para poder transducir la señal (Cantrell 2002).

La unión del TCR al complejo péptido-MHC es solo el primer paso en la formación de la sinapsis inmunológica, mediante la cual se constituye el complejo supramolecular de activación. Cuando el TCR se une al complejo péptido-MHC, los **correceptores CD4 y CD8** se unen al mismo tiempo a regiones no polimórficas de la molécula de MHC (Janeway 1992, Gao 2000). Existe una correlación total entre la restricción del TCR por moléculas MHC de clase I o de clase II, y el correceptor que exprese el linfocito T, CD8 ó CD4 respectivamente. Esto se debe a que, como se describió anteriormente, los correceptores juegan un papel determinante en el proceso de selección positiva de los timocitos DP, permitiendo que se alcance el nivel de señalización suficiente que rescata a los timocitos de la muerte por apoptosis (Veillette 1989).

INTRODUCCIÓN

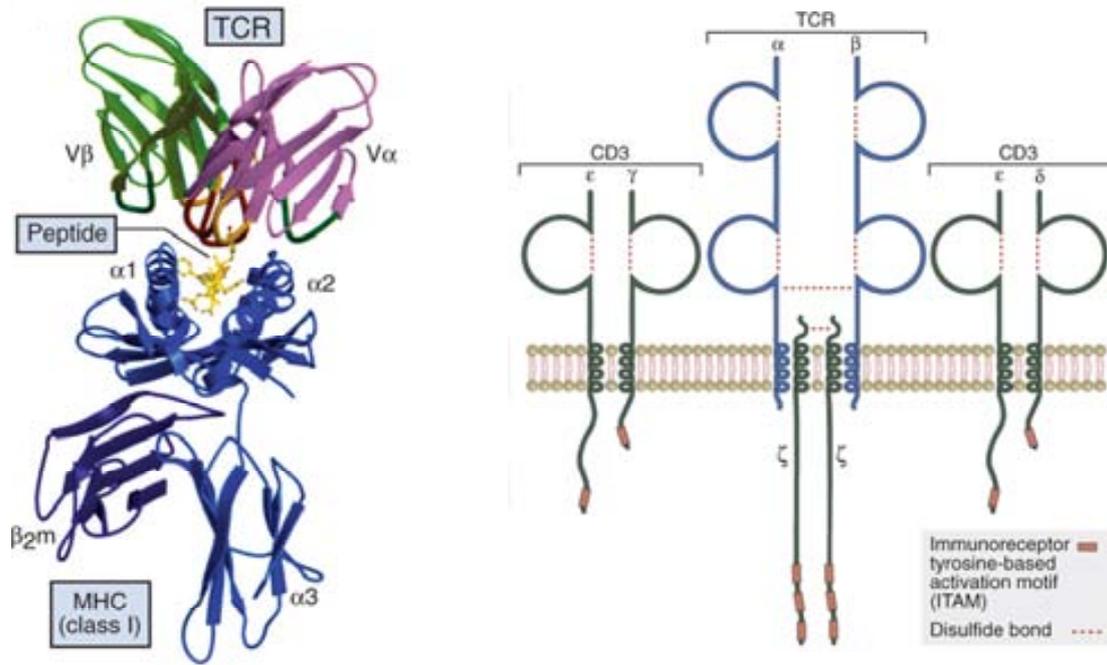


Figura I.5: Izquierda: Esquema de la interacción del TCR con el complejo péptido-MHC-I. Derecha: Esquema de la asociación de los componentes del complejo de activación TCR-CD3 (Abul K. Abbas. 6th Edition).

4. Respuesta inmune contra virus y tumores: células citotóxicas

Las células con función citotóxica son fundamentalmente los linfocitos T CD8+ (CTLs) y las células *Natural Killers* (NKs), aunque una pequeña fracción de linfocitos T CD4+ también pueden presentar actividad citotóxica. Cumplen una función muy importante, ya que tienen la capacidad de eliminar otras células que son peligrosas para el organismo, como por ejemplo células infectadas por virus y células tumorales. Sin embargo, en las respuestas antiviral y antitumoral también son importantes otros mecanismos del sistema inmune. Por ejemplo, cuando una célula es infectada por un virus se estimula la producción de IFN tipo I y se inhibe la replicación viral. Asimismo, los anticuerpos juegan un papel fundamental bloqueando la entrada de los virus en las células huésped. Los anticuerpos también podrían participar en la respuesta contra tumores, ya que podrían conducir a la eliminación de la célula tumoral mediante la activación del complemento o mediante el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (mediado por macrófagos y NKs con receptores Fc).

A continuación se describen las principales características de los linfocitos CD8+ y las células NKs y los modelos murinos de utilidad en el estudio del eje citotóxico.

4.1 Los linfocitos T CD8

Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) reconocen y eliminan células diana que expresan péptidos foráneos asociados a moléculas MHC de clase I. Los linfocitos T CD8+ que emigran del timo se denominan “pre-CTLs” puesto que, a pesar de ser linfocitos maduros, todavía son incapaces de eliminar células tumorales o células infectadas por virus. Tras un proceso de activación, proliferación y diferenciación, que se describe a continuación, se convierten en linfocitos T citotóxicos.

4.1.1 La vía endógena de presentación antigénica.

La mayoría de las proteínas presentes en el citosol son sintetizadas de forma endógena y presentadas de manera natural a través de las moléculas MHC de clase I. Este mecanismo tiene un papel fundamental en la respuesta inmune, por ejemplo, las células tumorales pueden sintetizar proteínas mutantes, y las proteínas virales se sintetizan mediante la maquinaria de la propia célula huésped infectada por dichos virus.

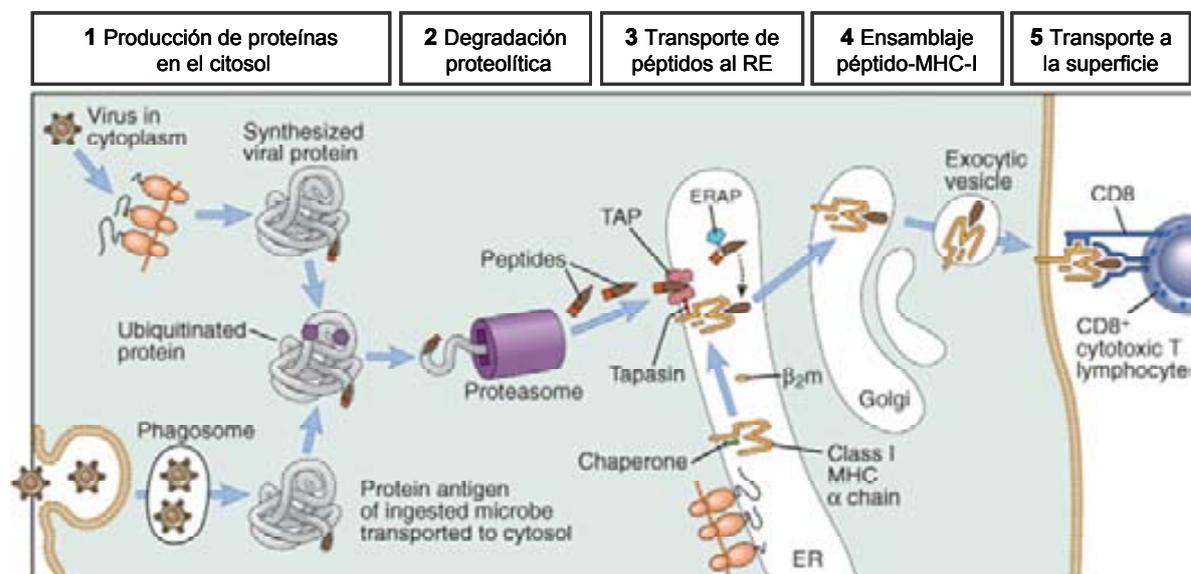


Figura 1.6: Esquema de la vía de presentación de antígenos por las moléculas MHC-I (Abul K. Abbas. 6th Edition).

Los péptidos asociados a las moléculas MHC-I se producen por degradación de las proteínas citosólicas, principalmente por el proteosoma. Estos péptidos son transportados desde el citosol hacia la luz del RE por el complejo TAP (transportador asociado al procesamiento del antígeno), compuesto por las subunidades TAP1 y TAP2.

INTRODUCCIÓN

Dichas proteínas pertenecen a la familia de transportadores con dominio ABC de unión al ATP. En la parte citoplasmática poseen los motivos A, B y C, involucrados en la unión al ATP y necesarios para el transporte de los sustratos, mientras que las mitades N-terminales de TAP1 y TAP2 forman los dominios luminal y transmembrana. La síntesis y el ensamblaje de las moléculas MHC-I se produce en forma dependiente de la unión del péptido (Cerundolo 1990, Spies 1992). El plegamiento de la cadena α de las moléculas de clase I (sintetizada en la luz del RE) y su dimerización con la β 2-microglobulina es asistido por proteínas chaperonas, y los dímeros permanecen unidos al complejo TAP a través de Tapasina. Cuando los péptidos ingresan al RE a través de TAP, se unen al dominio de unión de péptidos de las moléculas de clase I “vacías”, asociadas a TAP. Una vez unido el péptido, el complejo MHC-I-péptido es liberado del complejo de ensamblaje y es transportado hacia la membrana celular mediante el transporte vesicular RE-Golgi (Lankat-Buttgereit 2002, Figura 1.6). Una vez en la membrana celular, el complejo péptido-MHC-I puede ser reconocido por linfocitos T CD8+. Puesto que cualquier célula es susceptible de ser infectada por virus o de sufrir una transformación neoplásica, es muy importante la expresión ubicua de las moléculas MHC de clase I en todas las células nucleadas.

Asimismo existe una vía minoritaria de presentación de péptidos exógenos a través de moléculas MHC de clase I mediante el mecanismo denominado cross-presentación, y que se da fundamentalmente en un subtipo de células dendríticas (CD), en general CD8+. Cuando estas células fagocitan células apoptóticas infectadas por virus o células tumorales, se produciría una traslocación de los antígenos desde el fagosoma hacia el citosol. De esta forma, el mecanismo de cross-presentación permite que los linfocitos T CD8+ puedan recibir señales coestimuladoras por parte de las CDs, al presentar péptidos originados en otras células.

4.1.2 Activación de los linfocitos T CD8+ y diferenciación hacia linfocitos T citotóxicos

Para que pueda iniciarse una respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos (CTLs), los linfocitos T CD8+ *naïve* deben activarse, proliferar y diferenciarse en CTLs efectores. La **primera señal** de activación es el reconocimiento del péptido asociado al MHC-I por parte del TCR. Estos péptidos, como se acaba de describir, derivan de proteínas de virus o tumores que son degradadas en el citosol. La **segunda señal**

necesaria para la activación de los linfocitos T CD8+ *naïve* proviene de las señales coestimuladoras que facilita la célula dendrítica (CD) gracias al mecanismo de *cross-presentation* (Abul K. Abbas. “Cellular and Molecular Immunology”, 6th Edition). El grado de maduración que alcanza la CD es fundamental para la correcta diferenciación y supervivencia de los linfocitos. Una CD que no provee de señales coestimuladoras suficientes no solo no es eficiente en promover la diferenciación de los linfocitos T CD8+, sino que induce tolerancia mediante delección o anergia de dichos linfocitos. Una vez que el linfocito T CD8+ ha sido activado, para que se produzca una proliferación clonal eficiente y una diferenciación adecuada hacia células efectoras y de memoria se requiere de una **tercera señal**, mediada por IL-12 o INF tipo I producido por CDs maduras (Curtsinger 2003, Aichele 2006, Mescher 2007). Las CDs pueden madurar adecuadamente cuando existe el entorno inflamatorio propio de una infección por un patógeno. Este entorno facilita la interacción de polímeros derivados del patógeno con los Toll-like receptor (TLRs) presentes en las CDs, y la interacción CD40L presente en los linfocitos CD4 activados con CD40 en la CD (Bennett 1997, Williams 2007). Los linfocitos T CD4+ colaboradores son activados por antígenos microbianos que han sido fagocitados y procesados por APCs, que eventualmente podría ser la misma que presenta el antígeno a los linfocitos T CD8+ mediante el mecanismo de *cross-presentation*. Las células CD8 *naïve* comienzan a dividirse unas 24 horas después del primer encuentro con el antígeno si han recibido las señales coestimuladoras y una de las citocinas de la tercera señal (Ito 2002, Mescher 2007). Se producen múltiples ciclos de división, de forma que aproximadamente a los 5 días se alcanza el pico de expansión clonal y para entonces las células ya han desarrollado funciones efectoras (Figura 1.7).

Existe otro punto de control de la respuesta CTL que es dependiente de los linfocitos T CD4+ colaboradores Th1. A pesar de haberse producido una activación, proliferación y diferenciación correcta de los linfocitos T CD8, estos linfocitos pierden gradualmente la capacidad de secretar IL-2, de forma que mantienen sus funciones efectoras pero no pueden proliferar (Deeths 1999). Este proceso se denomina “falta de respuesta inducida por activación” o AINR, para diferenciarlo del proceso de anergia que sufren los linfocitos T CD4+ cuando reconocen el antígeno en ausencia de señales coestimuladoras. Los linfocitos T CD4+ colaboradores pueden revertir este proceso proporcionando la IL-2 necesaria para la proliferación de los linfocitos T CD8+. La IL-2 exógena produce la reversión del estado de AINR, que implica una recuperación

INTRODUCCIÓN

en la capacidad de producción de IL-2 por parte de los linfocitos T CD8+. Si el antígeno no es depurado durante la primera fase de expansión clonal de las CTLs, puede producirse la tolerancia a dicho antígeno o no, dependiendo de si existe producción de IL-2 por parte de los linfocitos T CD4 colaboradores.

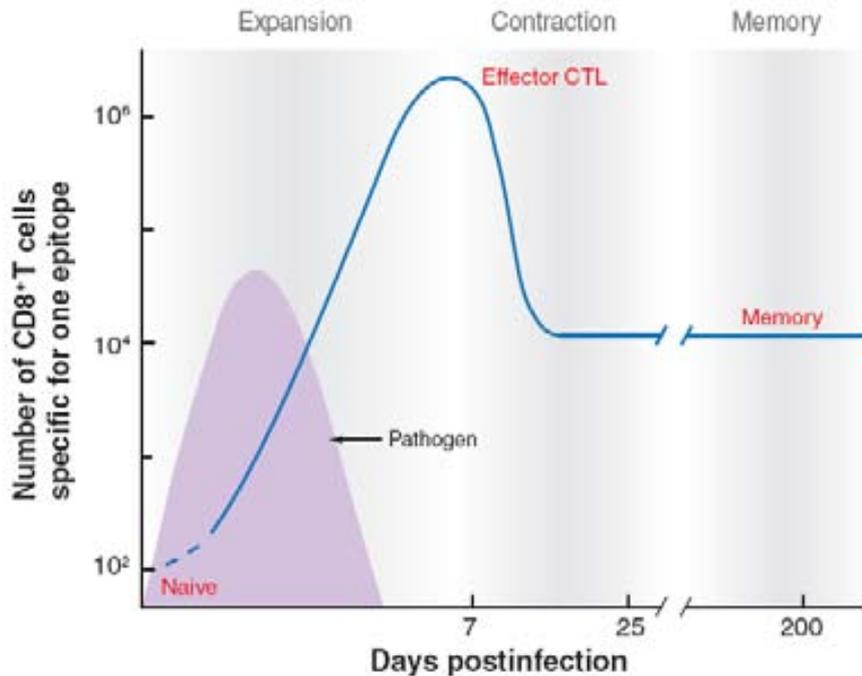


Figura 1.7: Esquema de la cinética de la respuesta citotóxica en ratones tras una infección viral (Williams 2007).

Cuando ya se ha depurado el antígeno, algunos linfocitos T efectores vuelven a expresar el receptor de la IL-7, de forma que los bajos niveles fisiológicos de IL-7 favorecerían un bajo nivel de proliferación y el desarrollo de células T de memoria (Kaech 2003). Otro mecanismo importante en la generación de linfocitos T de memoria parece ser la expresión de CD8 α , que se induce al mismo tiempo que la expresión del receptor de IL-7 en los linfocitos precursores de células de memoria, pero que, a diferencia de este, desaparece tras aproximadamente una semana (Madakamutil 2004, Prlic 2007).

Bases moleculares de la activación

El reconocimiento del antígeno por el TCR activa la vía Ras-MAPK, y la coestimulación mediada por CD28 activa la vía de la Inositol3FosfatoKinasa. Ambas vías sinergizan el aumento en la regulación de la transcripción mediadas por AP-1, NF-

AT y NF- κ B. La unión de las citocinas a sus respectivos receptores activa la vía Jak/Stat, y conduce a la dimerización de STATS fosforilados, su traslocación al núcleo, y la consiguiente regulación de la transcripción. El receptor de la IL-12, compuesto por las cadenas IL-12R β 1 y β 2, recluta JAK2 y Tyk2 y conduce a la fosforilación de STAT-4. Los IFN- α/β al unirse a su receptor, activan principalmente STAT-1 y STAT-2, aunque dependiendo del tipo celular también pueden activar STAT-3, 4 y 6 (Mescher 2007). El mecanismo por el cual la IL-12 y el IFN- α promueven la supervivencia de los linfocitos T CD8 activados a medida que se diferencian a células efectoras está mediado, al menos en parte, por el aumento en la expresión de Bcl-3 (Valenzuela 2005). Al igual que sucede en los linfocitos T CD4 anérgicos, en los linfocitos T CD8 en estado AINR se ha demostrado que existe un defecto en la vía ras-MAPK (Tham 2001). Es probable que el inhibidor PD-1 (programmed death), que al igual que CTLA-4 pertenece a la familia CD28, tenga un papel importante en la inducción de AINR (Carter 2002, Keir 2007). Actualmente se ha descrito como un marcador fundamental en los linfocitos T citotóxicos exhaustos durante la infección por VIH (Day 2006, D'Souza 2007).

4.1.3 Mecanismos efectores de los linfocitos T CD8+

El reconocimiento del péptido unido a la molécula MHC-I en la célula diana por parte del TCR dispara la formación de la sinapsis inmunológica en la CTL. A diferencia del linfocito CD8 naive, la CTL no requiere señales coestimuladoras para su activación. La activación de la CTL lleva a una rápida reorganización del citoesqueleto de forma que el centro organizador de microtúbulos (MTOC) se moviliza hacia el área citoplasmática cercana a la zona de contacto con la célula diana (Kuhn 2002).

4.1.3.1 Citólisis mediante secreción de gránulos de perforina/granzimas

Los gránulos secretorios lisosomales de la CTL se mueven a través de los microtúbulos hacia el MTOC, de forma que la exocitosis (fusión de los gránulos con la membrana plasmática y liberación de su contenido al exterior) se produce en la zona central de la sinapsis inmunológica (Stinchcombe 2001). Los gránulos secretorios lisosomales son lisosomas modificados que pueden sufrir una secreción regulada en función de un estímulo externo, un mecanismo que es utilizado por muchos tipos celulares (Stinchcombe 1999, Holt 2006). Las CTLs y las células NKs poseen perforina y granzimas, dos proteínas fundamentales para inducir la apoptosis de la célula diana.

INTRODUCCIÓN

La perforina es una proteína de 65KDa soluble en agua que tiene la capacidad de formar agregados en forma dependiente de calcio. Estos agregados se insertan en la membrana de la célula diana formando poros, de forma que facilitan la entrada de las granzimas. Las proteínas granzimas son una subfamilia de serin proteasas que se expresan exclusivamente en células CTLs y NKs (Kam 2000). Tienen distinta especificidad de sustrato, granzima A corta luego de una lisina, mientras que granzima B corta después de ácido aspártico. Granzima B tiene un papel fundamental en la inducción de apoptosis de la célula diana ya que activa procaspasas, pero la inducción de la apoptosis es un proceso más complejo, que requiere de la supresión de inhibidores de caspasas (Goping 2003). Granzima A no dispara el mecanismo de apoptosis mediante la activación de procaspasas, sino que induce una cascada que culmina con el daño del DNA en forma de cortes simple cadena. La granzima A corta parte de un complejo del RE que contiene una DNase inactiva, que se activa por el corte y se trasloca al núcleo (Beresford 2001, Fan 2003).

4.1.3.2 La vía apoptótica Fas/Fas ligando

Las CTLs utilizan otro mecanismo de citólisis que involucra la interacción entre Fas, expresado en la membrana de la célula diana, con FasL, cuya expresión en la membrana de la CTL se induce como consecuencia del reconocimiento del péptido. Una parte de FasL se encuentra almacenado en los gránulos secretorios junto con la perforina y granzimas, de forma que se utiliza el mismo mecanismo de secreción regulada que se explicó anteriormente. La activación de la CTL también conduce a la síntesis *de novo* de FasL, y a su expresión en la membrana (Kojima 2002). Para que se induzca la muerte celular, la célula diana debe expresar un “dominio de muerte” intracelular intacto en la molécula Fas, y la vía no debe estar bloqueada por inhibidores. Las cadenas de Fas se asocian en un trímero mediante dominios de asociación presentes en el primer dominio rico en cisteína (CRD, Rieux Laucat 2003). Al formarse el trímero se constituye el “dominio muerte”, llamado así porque alrededor de él se ensambla el complejo DISC (*death-inducing signal complex*). La forma funcional de FasL también es un homotrímero. Tras la unión de ambas parejas de trímeros se produce el ensamblaje del complejo DISC, que consiste en la asociación de tres dominios muerte de Fas, la proteína FADD (*Fas associated death domain protein*), procaspasa-8 (isoformas FLICE, MATCH α 1, MATCH α 2), procaspasa-10, y FLIP (celular FLICE inhibitory protein) (Figura 1.8). Procaspasa-8 y procaspasa-10 sufren un clivaje

por parte de FADD y se produce así una cascada de activación sucesiva de distintas proteasas que culmina con la activación de los principales efectores del programa de apoptosis: caspasa-3 y caspasa-9. En algunos tipos celulares la concentración de caspasa-8 en el complejo DISC es baja, y se requieren mecanismos de amplificación adicionales para que se induzca la apoptosis (Oliveira 2008). Uno de ellos es el corte de BID (*BH3-interacting-domain death agonist*) por caspasa-8 activa para generar BIDt (BID truncado), que induce la agregación de Bax (*Bcl-2-associated X protein*) a nivel mitocondrial y la liberación de citocromo C. Una vez en el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 (*apoptotic protease-activating Factor*) para formar, junto con procaspasa-9, el apoptosoma. La formación de este gran complejo proteico conlleva la activación de caspasa-9, que a su vez activa a otras caspasas efectoras (caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7) y, como consecuencia, se induce la apoptosis.

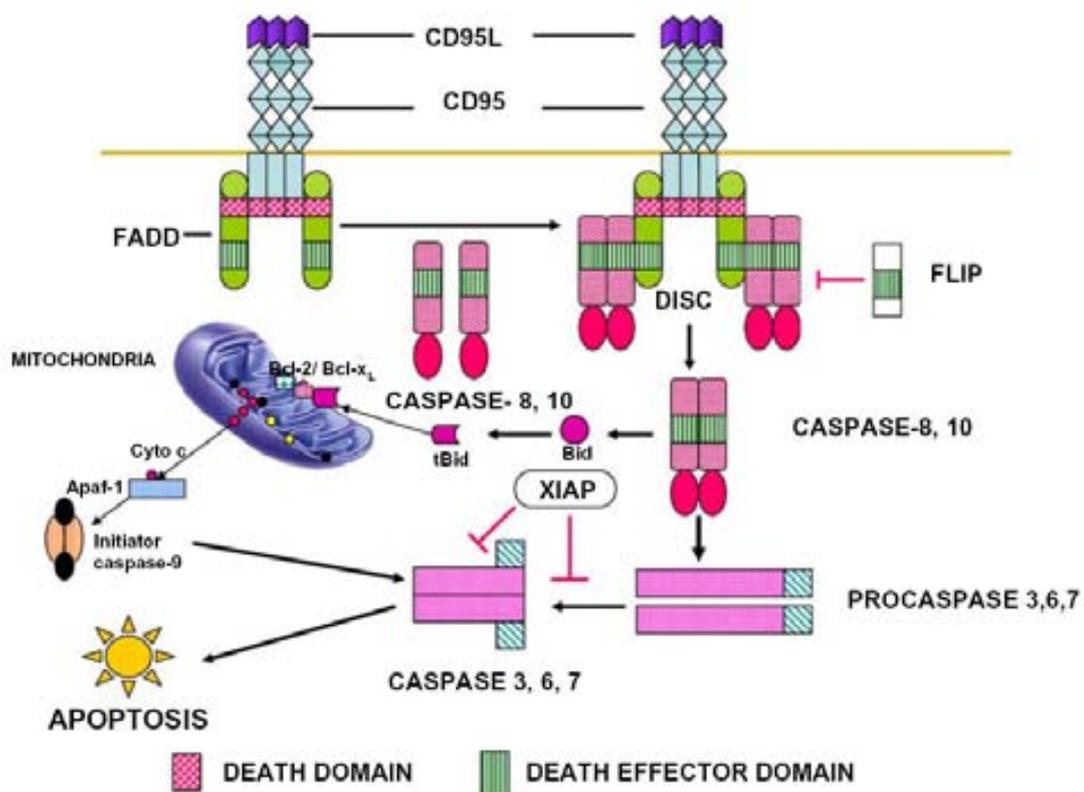


Figura 1.8: Esquema de la vía de apoptosis inducida por Fas (Oliveira 2008).

El proceso de apoptosis incluye la permeabilización de la membrana, la fragmentación del DNA, la condensación y la segmentación del núcleo, y la generación de los cuerpos apoptóticos que son rápidamente fagocitados por los macrófagos. El uso relativo de los dos mecanismos principales de citólisis (dependiente de perforina o

INTRODUCCIÓN

de Fas) *in vivo*, dependerá tanto de las propiedades de la célula efectora como de la célula diana (Kafrouni 2001). La vía dependiente de FasL podría ser importante en la actividad citolítica de algunos linfocitos T CD4. En los linfocitos T CD8 parece tener un papel más importante en la homeostasis de la respuesta CTL, mediante el mecanismo de apoptosis que se produce durante la fase de contracción de la respuesta efectora, que se discutirá más adelante en el apartado 7.2.2. Una CTL puede matar varias células diana, por lo que para inducir la apoptosis de cada célula solo se requiere la liberación de una pequeña proporción de gránulos citotóxicos. Además de producirse la expresión de FasL en la membrana de la CTL, y la liberación de perforina y granzimas, la exocitosis de los gránulos lleva a la liberación de proteasas lisosomales. Se ha propuesto que estas proteasas, como la catepsina B, degradan los mediadores citotóxicos que retrodifunden hacia la CTL, y este podría ser uno de los mecanismos de los que dispone la CTL para sobrevivir a la liberación de gránulos citotóxicos (Balaji 2002).

4.1.3.3 Secreción de citocinas

Muchas veces para controlar una infección *in vivo* las CTLs utilizan principalmente el mecanismo efector no citolítico de secreción de interleucinas, como IFN γ y TNF α/β (Guidoti 2001). La secreción de TNF es un mecanismo antitumoral importante. El TNF induce apoptosis en muchas células diana, al unirse al TNFR que tiene, al igual que Fas, un dominio muerte en su porción intracelular. Por otra parte, el IFN γ es un potente activador de macrófagos.

4.1.4 Subpoblaciones de linfocitos CD8: Marcadores fenotípicos

Durante la respuesta CTL se genera una gran expansión clonal para asegurar un número suficiente de células efectoras. A medida que el antígeno es depurado, la mayoría de las células efectoras mueren y, paralelamente, se genera una población de células de memoria fenotípicamente distinta (CD45RA⁻). Esta población de memoria puede dividirse, a su vez, en linfocitos T de memoria centrales (T_{CM}) y linfocitos T de memoria efectoras (T_{EM}), según sus características fenotípicas (Sallusto 2004, Tomiyama 2004). Las células T_{CM} expresan CD62L y CCR7, de forma que tienen capacidad de migrar a los nódulos linfoides (NL) y proliferar rápidamente en caso de una reexposición al antígeno (Butcher 1996). Las células T_{EM}, al no expresar CD62L ni

CCR7, pueden migrar a los tejidos periféricos (Butcher 1996). Ambas poblaciones tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse en células efectoras con alto contenido de perforina y granzimas y negativas para las moléculas coestimuladoras CD27 y CD28 (Figura I.9). Estos linfocitos efectoras tienen una gran capacidad citolítica pero al igual que las CTLs generadas a partir de linfocitos CD8 *naive* tienen vida corta (Wherry 2003). Sin embargo, algunas células efectoras derivadas de células T_{CM}, son capaces de reexpresar los marcadores de *homing* hacia NL y de células memoria, restableciendo así los reservorios de T_{CM} y T_{EM}.

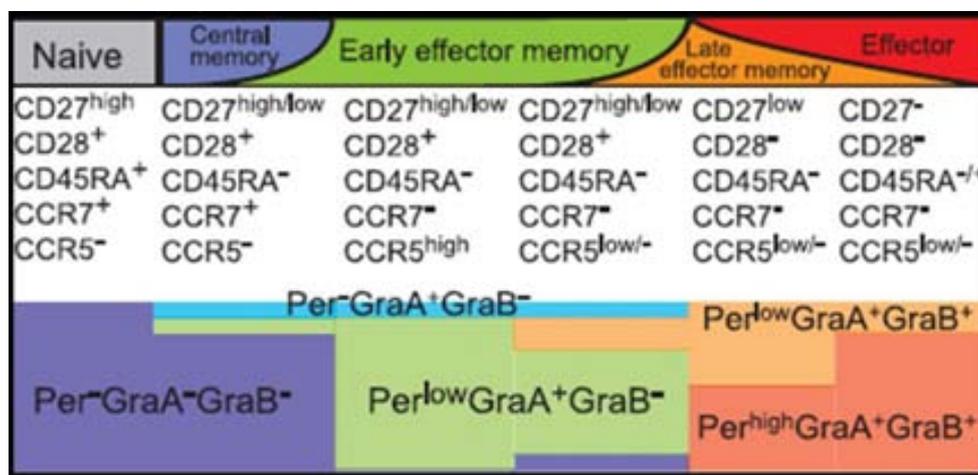


Figura I.9: Expresión de marcadores de superficie y moléculas efectoras durante la diferenciación de los linfocitos T CD8+ (Takata 2006).

4.2 Las células *Natural Killers* (NKs)

Las células NKs se enmarcan en la llamada **inmunidad innata** debido a que no poseen receptores generados por recombinación somática. Algunas de sus funciones, sin embargo, dependen de la inmunidad adaptativa (como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o ADCC) o colaboran con ella (coestimulación por contacto de linfocitos T y B), de forma que las células NKs actúan como puente en un ciclo interactivo entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Orange 2006). El término *natural killer* deriva del hecho de que no requieren una sensibilización previa para diferenciarse hacia células citotóxicas. Las células NKs se desarrollan a partir de un progenitor linfocitario común residente en la médula ósea, pero muy temprano en el desarrollo divergen de otros linajes de linfocitos (Colucci 2003). Las células NKs no

INTRODUCCIÓN

expresan TCRs, inmunoglobulinas, ni CD3 en su superficie. Expresan CD56 (la molécula 1 de adhesión a células neuronales), y aunque se cree que no tiene ninguna función importante, permite identificar dos subpoblaciones según los niveles de expresión de CD56 (Cooper 2001). Las células NKs con baja expresión (CD56^{dim}) representan la gran mayoría (95%), y tienen características de “células asesinas”, ya que expresan altos niveles del receptor Fc- γ (CD16) y de perforina. La alta expresión de CD56 (CD56^{hi}) parece correlacionarse más con un subtipo de células NKs con capacidad inflamatoria o regulatoria, ya que estas células expresan bajos niveles de perforina y CD16 pero expresan altos niveles de citocinas. La función principal de las células NKs es la defensa antiviral y antitumoral (Hokland 2005). Poseen un gran número de gránulos citolíticos que contienen perforina y granzimas, de forma que una vez producido el contacto entre la célula NK y la célula diana se produce la polarización de los gránulos hacia la zona de la sinapsis inmunológica, la exocitosis del contenido de los gránulos, y la lisis de la célula diana. Además de la actividad citotóxica, las células NKs tienen una gran capacidad para producir citocinas, principalmente IFN- γ (Loza 2002). Asimismo, expresan varios ligandos como CD40L y OX40L, de forma que pueden proveer señales coestimuladoras a los linfocitos T y B (Zingoti 2004). Existen tres tipos de situaciones capaces de disparar la activación de las células NKs: reconocimiento de células recubiertas de anticuerpo, reconocimiento de células infectadas por virus (y algunos patógenos intracelulares), y reconocimiento de células que no expresan de forma correcta las moléculas de MHC-I. Puesto que la activación de las células NKs depende del balance en la señalización de receptores inhibidores y activadores (Lanier 2005, Tomasello 2000), el mecanismo por el cual las situaciones recién mencionadas llevan a la activación de las células NKs puede estar mediado por un aumento en la señalización de los receptores activadores o por una disminución en la señalización de los receptores inhibidores.

4.2.1 Receptores de las células NKs

4.2.1.1 Receptores inhibidores

La mayoría de receptores inhibidores de las células NKs pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas o a la familia de las lectinas (Tomasello 2000). Una característica común de los receptores inhibidores es la presencia de un motivo intracelular ITIM (*Immunotyrosine-based inhibitory motive*). Tras la unión del receptor

con el ligando la tirosina se fosforila y se produce el reclutamiento de fosfatasa con dominio SH2, que defosforilan dianas intracelulares claves impidiendo así la activación de la célula NK. Los ligandos de los receptores inhibidores son las moléculas de MHC de clase I, clásicas (HLA-A, B, C) y no clásicas (HLA-E, G), de forma que su función es reconocer “lo propio” y así prevenir que las células NKs ataquen a las células normales (Orange 2006, Raulet 2001). Como estrategia de evasión de la presentación antigénica a los linfocitos CD8 citotóxicos, las células infectadas por virus y las células tumorales suelen disminuir la expresión de las moléculas de HLA-I. Sin embargo, la baja expresión de HLA-I hace que pierdan la capacidad de actuar como ligando de los receptores inhibidores de las células NKs, aumentando así la probabilidad de convertirse en sus dianas.

En humanos se han caracterizado al menos 14 genes diferentes que codifican para receptores tipo inmunoglobulina de las células NKs (KIRs), la mayoría de los cuales poseen motivos ITIM y son inhibidores. Se expresan en forma aleatoria (e independiente del haplotipo HLA) en los diferentes clones de células NKs. Sin embargo, existe un proceso de “educación” dependiente de las moléculas MHC-I que elimina las células NK potencialmente autorreactivas, asegurando que cada clon posea “al menos” un receptor inhibidor específico para alguna de las moléculas propias de MHC-I (Raulet 1997, Valiante 1997).

Dentro de los receptores inhibidores de la familia de las lectinas se encuentran NKG2A/B, que se encuentran asociados con la cadena invariante CD94. El ligando fundamental de NKG2A es la molécula de MHC clase I no clásica HLA-E. Presenta péptidos derivados de la secuencia señal de las moléculas HLA-A, B y C, de forma que actúa como un censor de la ruta biosintética de las moléculas HLA-I clásicas (Orange 2006).

4.2.1.2 Receptores activadores

Las células NKs disponen de varios tipos de receptores activadores que contrarrestan la función de los receptores inhibidores y pueden conducir a la activación celular, ya sea disparando los mecanismos citotóxicos, la proliferación, la producción de citocinas, o una combinación de estos mecanismos (Orange 2006). Entre los receptores activadores más importantes se encuentran:

- NCRs (*Natural Cytotoxicity Receptors*). En este grupo se incluyen NKp30, NKp44, NKp46 y NKp80 (Biassoni 2001). En algunos casos no se conoce el ligando, pero se

INTRODUCCIÓN

sabe que NKp44 y NKp46 unen la hemaglutinina del virus de la influenza, por lo que serían importantes en la defensa contra este virus.

- FcγRIII o CD16. Este receptor media el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).
- 2B4. Su ligando es CD48, y su expresión se induce en células infectadas por EBV.
- NKG2D. Une ligandos como MICA y MICB, cuya expresión aumenta en células transformadas o infectadas, y ULBPs (UL 16 binding proteins), que sufren una regulación positiva cuando se produce daño del DNA (Raulet 2003).
- Receptores de citocinas. Los receptores de IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 y INF-αβ traducen señales en respuesta a estas interleucinas que llevan a un aumento de la proliferación y/o actividad citotóxica de las células NKs.

4.2.2 Mecanismo de tolerancia de las células NKs

Las células normales expresan diferentes combinaciones y niveles de ligandos que pueden unirse a los receptores activadores e inhibidores correspondientes de las células NKs. Asimismo, cada célula o clon de células NKs expresa una combinación y una proporción variable de receptores inhibidores y activadores. Tiene que existir, por tanto, algún mecanismo que garantice la “tolerancia” frente a la gran variabilidad de combinaciones receptores/ligandos que pueden producirse cuando una célula NK encuentra una célula sana.

Durante mucho tiempo se consideró que la tolerancia estaba asegurada por el hecho de que cada célula NK posea, al menos, un receptor inhibitorio KIR capaz de reconocer una de las moléculas de HLA-I propia (Raulet 1997, Valiante 1997). Sin embargo, en ratones deficientes en MHC-I (ver 4.3.1.2), las células NKs no son autorreactivas a pesar de la ausencia de ligandos inhibitorios MCH-I. Se ha propuesto que estas células NKs poco respondedoras se generarían como resultado de una estimulación persistente no compensada por señales inhibitorias (Raulet 2001, Gasser 2006, Fernández 2005), de forma que este estado de hiporrespuesta podría ser consecuencia de una “compensación a la baja” de las señales estimulatorias para favorecer la tolerancia.

4.3 Modelos murinos de utilidad en el estudio del eje citotóxico

4.3.1.1 Knock outs de CD8

El correceptor aumenta la sensibilidad del linfocito T para un determinado péptido antigénico, de forma que aquellos TCRs de menor afinidad por su ligando (Holler 2003, Kerry 2003) son capaces de transducir una señalización suficiente para superar el umbral de activación del linfocito T CD8. Sin embargo, tal vez la aportación más importante del correceptor se produzca a nivel central, durante la selección positiva de los timocitos restringidos para MHC-I. Los primeros estudios con modelos murinos knock outs para CD8 (CD8KO) mostraron que en ausencia del correceptor, la población de células TCR $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ es muy baja (entre el 1 y el 2% del total de linfocitos), indicando que CD8 tiene un papel muy importante para la selección positiva de los linfocitos T restringidos para MHC I. Asimismo, se encontró una respuesta citotóxica frente a aloantígenos y antígenos virales severamente disminuida (Bachmann 1995, Fung-Leung 1991a, Fung-Leung 1991b). En este contexto, solo los timocitos restringidos para MHC-I que presenten un TCR con una elevada afinidad por el ligando, serían capaces de superar el proceso de selección positiva (Goldrath 1997). Recientemente y utilizando técnicas más sensibles (tetrameros MHC-I) se demostró que los ratones CD8KO son capaces de generar una respuesta específica de virus (PyV y rVSV) restringida para MHC-I aunque más lenta y de menor intensidad que los ratones WT (Andrews 2008, Riddle 2008). La diversidad en el repertorio de TCRs específicos para un epítipo viral es extremadamente baja en los ratones CD8KO. Este hecho probablemente indique una baja eficiencia de la selección positiva de los timocitos restringidos para MHC-I, ya que sin la contribución de CD8 solo un pequeño número de TCRs tendrían la afinidad necesaria para transmitir la señal de la selección positiva (Sebzda 1997, Kerry 2003, Goldrath 1997). Por lo tanto, el correceptor parece “facilitar” la selección positiva de los timocitos restringidos para MHC-I y también la función efectora de los linfocitos maduros, pero no sería imprescindible para ninguno de los dos procesos.

4.3.1.2 Modelos murinos con deficiencia de MHC de clase I

Las moléculas MHC-I clásicas se componen de una cadena pesada polimórfica codificada por los genes de la región I del complejo principal de histocompatibilidad (L,

INTRODUCCIÓN

D y K en ratones y A, B y C en humanos), que se asocia con la cadena liviana invariante β 2-microglobulina (β 2m). Como se describió en el apartado 4.1.1, el ensamblaje de la cadena pesada con β 2m en el interior del retículo endoplásmico (RE) es un proceso complejo, asistido por proteínas chaperonas y dependiente de la unión del péptido (Spies 1992). Dicha dependencia se demostró gracias a la caracterización de líneas celulares deficientes en TAP (Cerundolo 1990). En estas células la mayoría de las moléculas MHC-I permanecen en el RE y aquellas que llegan a la superficie sin péptido son inestables a 37°C.

Se han generado ratones deficientes en MHC-I mediante la disrupción de genes que codifican para **β 2-m** (Koller 1990), para la subunidad **TAP1** (Van Kaer 1992), y para **Tapasina** (Grande 2000). Los ratones deficientes en β 2-m son los que presentan la mayor reducción de MHC-I, pero además presentan mucha más patología asociada como, por ejemplo, hemocromatosis (Grande 2000). Al igual que sucede en las líneas celulares deficientes en TAP, las células de los ratones TAP1^{-/-} son incapaces de expresar moléculas MHC-I de forma estable en su superficie. En ausencia de Tapasina, la mayoría de las moléculas MHC-I abandonan el RE sin el péptido unido, de forma que su expresión y su estabilidad en la superficie está disminuida, aunque en menor grado que en los ratones deficientes en β 2-m y TAP. El número absoluto de linfocitos T $\alpha\beta$ CD8⁺ se encuentra severamente disminuido en los modelos β 2-m^{-/-} y TAP1^{-/-}, mientras que en los ratones deficientes en Tapasina esta disminución es mucho más moderada. El bajo número de linfocitos T $\alpha\beta$ CD8⁺ y la incapacidad de los ratones TAP1^{-/-} para generar una respuesta citotóxica específica contra diversos virus, sugiere que el suministro de péptidos por parte de TAP jugaría un papel importante en la inducción de la respuesta restringida para MHC-I. Bajo ciertas circunstancias, sin embargo, se ha demostrado que los ratones deficientes en TAP1 pueden generar una respuesta citotóxica específica de virus restringida para MHC-I (Paliard 2001).

A pesar de la ausencia de ligandos inhibitorios, las células NKs de los ratones deficientes en MHC-I no son autorreactivas. Se ha demostrado que dichas células NKs muestran una serie de defectos funcionales en comparación a las células NKs de ratones normales. Por ejemplo, tienen una menor capacidad de rechazo de trasplantes alogénicos de médula ósea, muestran una ADCC reducida, y una menor capacidad de lisis de células tumorales (Dorfman 1997, Fernández 2005).

4.3.1.3 Modelos de deficiencia del mecanismo de secreción de gránulos citotóxicos

La vía citotóxica mediada por la liberación de gránulos por parte de los linfocitos T CD8 y las células NKs es un mecanismo fundamental para el control de las infecciones virales e infecciones producidas por bacterias intracelulares, pero también es imprescindible para el mantenimiento de la homeostasis. Los **ratones deficientes en perforina** presentan una disregulación muy severa del sistema inmune (Kagi 1994). Las fases de reconocimiento antigénico, activación, y expansión clonal de los linfocitos T CD8 en respuesta a una infección ocurren con normalidad. Sin embargo, puesto que dichos linfocitos son incapaces de eliminar las células infectadas, tampoco se elimina la fuente de estimulación antigénica. Las grandes cantidades de citocinas producida por los linfocitos T CD8 activados, principalmente INF- γ , conducen a la activación de los macrófagos. Estos, a su vez, infiltran los tejidos y producen grandes cantidades de TNF- α , IL-1, e IL-6, produciéndose un cuadro inflamatorio generalizado con severos daños tisulares (Rosi 1998, Kagi 1999, Jordan 2004). En ambientes controlados libres de patógenos, los ratones deficientes en perforina se mantienen sanos (kagi 1994, Jordan 2004), sin embargo, cuando entran en contacto con ciertos virus, tales como el LCMV, desarrollan una respuesta exagerada y mueren al cabo de pocas semanas como consecuencia de una infiltración masiva de diversos órganos por linfocitos y macrófagos activados. Este cuadro se denomina Síndrome de Linfocitosis Hemofagocítica (HLH), y es idéntico al que se produce en personas con deficiencias en alguno de los componentes del sistema de secreción de gránulos citotóxicos (Jordan 2004). El mismo fenotipo presentan los ratones que tienen una mutación en homocigosis en el gen ***Unc13d*** (Croizat 2007), el gen ortólogo a *MUNC13-4* en humanos, causante de Linfocitosis Hemofagocítica Familiar tipo 3 (FHL3). La proteína UNC13-D interviene en la fusión de las vesículas citoplasmáticas, y es fundamental en células NKs y CTLs, mientras que en otras células como los melanocitos y las neuronas se expresarían proteínas homólogas.

Cuando la afectación involucra a componentes comunes de la vía de secreción, la inmunodeficiencia suele ir acompañada de otros trastornos. Los ratones *ashen* son un modelo de albinismo parcial y defectos en la actividad citotóxica de los linfocitos CD8 y las células NKs (de forma similar a lo que sucede en el déficit de perforina) debido a una mutación espontánea en el gen que codifica para la proteína **Rab27a** (Wilson 2000, Haddad 2001). Además de intervenir en la exocitosis de los gránulos citotóxicos (Ménasché 2000), Rab27a participa en el transporte de los melanosomas,

INTRODUCCIÓN

lo cual explica el defecto en la distribución de la melanina (Bahadoran 2001). Otro modelo espontáneo de afectación de la vía regulada de secreción de gránulos es el de los ratones *beige* (Holcombe 1987). Nuevamente existe una asociación de HLH con albinismo parcial, pero en este caso el gen implicado es *Lyst*, un gen extremadamente extenso (55 exones). La proteína parece estar involucrada en el tráfico vesicular de proteínas desde y hacia los lisosomas, al interactuar con componentes del complejo t-SNARE (Tchernev 2002).

4.3.1.4 Modelos de afectación de la vía Fas/FasL

Los ratones **MRL** *lpr* se consideraron durante mucho tiempo como un modelo de enfermedades por depósito de inmunocomplejos (Theofilopoulos 1981), a pesar de no presentar características típicas del lupus como anticuerpos anti-DNA o artritis. Estos ratones presentan un cuadro autoinmune más agresivo que la cepa parental MRL, y además tienen hiperplasia linfoide y un elevado número de linfocitos T CD4⁻ CD8⁻ (doble negativos). Coincidiendo con la primera descripción de niños con síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) (Sneller 1992), se identificó en los ratones *lpr* una mutación espontánea en homocigosis en el gen que codifica para Fas (*TNFRSF6*), y que produce una disminución muy marcada de la expresión de la proteína (Watanabe-Fukunaga 1992). La similitud de las manifestaciones clínicas entre el modelo murino y los pacientes (hiperplasia linfoide, enfermedad autoinmune y aumento en el número de linfocitos T CD4-CD8-) facilitó el descubrimiento de los defectos en Fas en humanos (ALPS tipo Ia). Un fenotipo similar se encuentra en los ratones *lpr^{tg}*, que poseen una mutación puntual en el dominio muerte de Fas, y en los ratones *gld*, que poseen un defecto recesivo en FasL (Ligando de Fas) y representa la forma equivalente al ALPS tipo Ib en humanos.

La mayor parte de los linfocitos T maduros pasan por las etapas de activación, respuesta efectora, y muerte celular programada. El proceso de apoptosis mantiene la homeostasis del sistema inmune, puesto que evita la acumulación de linfocitos (principalmente linfocitos T CD8) tras la expansión en respuesta al estímulo antigénico. Existen dos mecanismos que llevan a la muerte de los linfocitos una vez que ha finalizado el estímulo. La apoptosis “pasiva” mediada por mecanismos mitocondriales que obedecen a una deficiencia de IL-2 como resultado de la eliminación del antígeno, y la apoptosis “activa” que requiere la interacción de proteínas de superficie, principalmente Fas y FasL, y que se describe en el apartado 4.1.3.2.

Los **ratones transgénicos para mutaciones en el dominio muerte de Fas** (Choi 1999), permitieron reproducir el efecto dominante negativo que se observa en la gran mayoría de pacientes con ALPS (explicado más adelante en 7.2.2).

Los modelos murinos han resultado muy útiles para poder evaluar las relaciones entre la apoptosis dependiente de Fas y otros moduladores de la respuesta inmune. Sin embargo, existen diferencias importantes entre la vía de apoptosis murina y la humana que deben tenerse en cuenta a la hora de extrapolar mecanismos. Por ejemplo, los ratones no tienen el gen de la caspasa-10, que en humanos se localiza justo al lado del gen de caspasa-8. Los **knock outs de caspasa-8** tienen defectos cardíacos y hematopoyéticos que producen la muerte intrauterina (Varfolomeev 1998), mientras que en humanos los defectos en homocigosis de caspasa-8 producen un cuadro de ALPS e inmunodeficiencia, que junto con los defectos en caspasa 10 se agrupan en la variante de ALPS tipo II.

5. El correceptor CD8

La glicoproteína CD8 puede expresarse en la superficie celular bajo dos formas moleculares diferentes. El heterodímero $\alpha\beta$ es la forma predominante en timocitos y en linfocitos T maduros restringidos para MHC-I, mientras que el homodímero $\alpha\alpha$ se expresa en un subset de células NKs y linfocitos T intraepiteliales (IEL) TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ del intestino (Cheroutre 2004, Moebius 1991). Asimismo, la expresión de CD8 $\alpha\beta$ y CD8 $\alpha\alpha$ en timocitos está regulada en forma dependiente del estadio de desarrollo (Garefalaki 2002, Feik 2005), y CD8 $\alpha\alpha$ también puede expresarse junto con CD4 (Kenny 2004) y CD8 $\alpha\beta$ (Konno 2002) en algunos linfocitos T $\alpha\beta$ maduros activados.

La función de CD8 $\alpha\beta$ como correceptor del TCR está mediada básicamente por dos mecanismos diferentes, pero que actúan coordinadamente: 1) La estabilización de la unión del TCR a su ligando Péptido/MHC-I y 2) La amplificación de la transducción de la señal del TCR. La función fisiológica de CD8 $\alpha\alpha$ es menos conocida. Se ha descrito frecuentemente como un correceptor “ineficiente”. Sin embargo, como se describe más adelante, cada vez existen más evidencias de que CD8 $\alpha\alpha$ funcionaría en realidad como un “correpresor”.

INTRODUCCIÓN

5.1 Estructura

A pesar de que las subunidades CD8 α y CD8 β comparten una identidad de secuencia aminoacídica de sólo el 20% presentan una topología muy similar (Norment and Littman 1988, Chang 2005). Ambas subunidades están compuestas por un dominio perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas tipo variable (*IgSF-V like*, Figura I.10 B), una región extendida de 31-50 residuos rica en serina, treonina y prolina con un elevado grado de O-glicosilación, una región transmembrana, y un dominio intracelular corto (Figura I.10 A). La estructura de ambas cadenas está extremadamente conservada en la filogenia.

La contribución a la unión con el MHC-I que ejerce la subunidad α en CD8 $\alpha\beta$ o la subunidad designada como “ $\alpha 1$ ” en el caso del homodímero CD8 $\alpha\alpha$ ($\alpha 1\alpha 2$), es mayor (70%) que la que ejercen las subunidades β o $\alpha 2$ en CD8 $\alpha\beta$ o en CD8 $\alpha\alpha$, respectivamente (en ratones la subunidad β adopta la conformación equivalente a la subunidad “ $\alpha 1$ ” – Chang 2005). Mientras que los residuos localizados en los *loops CDR-like* de los dominios *IgSF-V like* de ambas subunidades ($\alpha\beta$ o $\alpha 1\alpha 2$) contactan con el dominio $\alpha 3$ no polimórfico de las moléculas de MHC de clase I (Devine 1999, Kern 1999), solo la subunidad “ $\alpha 1$ ” hace contactos adicionales con el dominio $\alpha 2$ de MHC-I y con $\beta 2m$ (Figura I.10 C).

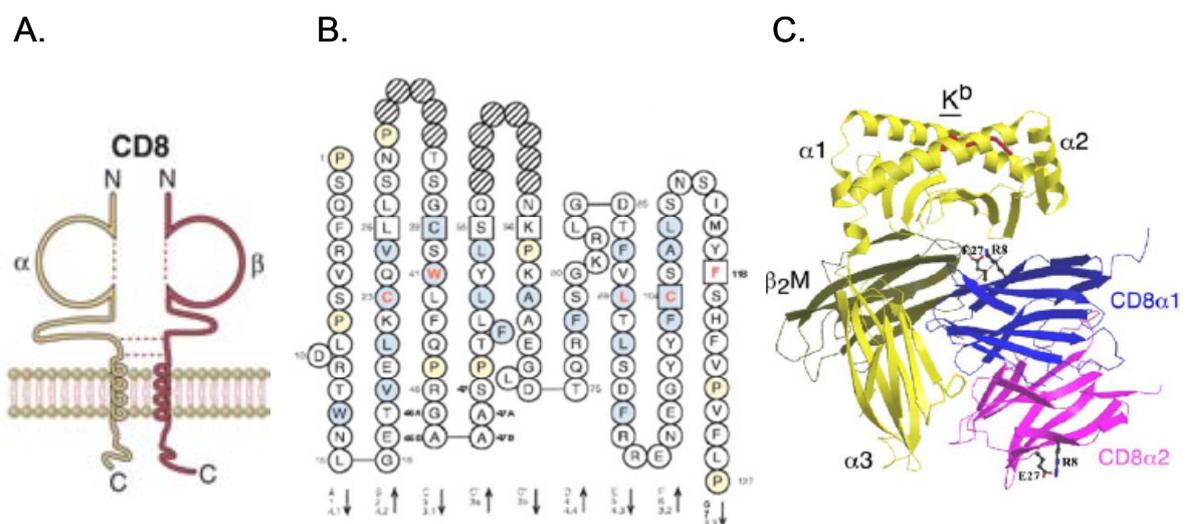


Figura I.10: A. Esquema del correceptor CD8 $\alpha\beta$ (Abul K. Abbas, 6th Edition). B. Dominio *Ig V-like* (Lefranc 2003). C. Esquema de la interacción CD8 MHC-I (Chang 2005).

La región citoplasmática de CD8 α (pero no de CD8 β) contiene dos cisteínas vecinas que interaccionan con la protein tirosin kinasa p56^{lck} (Veillette 1988, Bosselut

1999). Cuando CD8 α se acopla al complejo de activación TCR-CD3:Ag-MHC, la p56^{lck} asociada a su cola citoplasmática fosforila los motivos ITAM de CD3 ζ , y como consecuencia se produce el reclutamiento y la fosforilación de ZAP-70. Asimismo, la región citoplasmática de CD8 α también puede unir LAT (linker of activation of T cells - Bosselut 1999), que participa en eventos posteriores de la cascada de activación TCR-CD3.

5.2 Función de CD8 $\alpha\beta$ y CD8 $\alpha\alpha$

A simple vista pareciera que la subunidad α por sí misma fuese capaz de cumplir con las dos funciones del correceptor: amplificación de la señal y estabilización de la unión al complejo pMHC-I. Sin embargo, CD8 $\alpha\beta$ es mucho más eficiente que CD8 $\alpha\alpha$ como correceptor. De hecho, en ratones deficientes en CD8 β , CD8 $\alpha\alpha$ es incapaz de promover eficientemente la selección positiva de timocitos restringidos para MHC-I (Nakayama 1994, Crooks 1994, Fung-Leung 1994,) o la activación mediada por TCRs dependientes de CD8 (McNicol 2007). Por otra parte, cuando se expresa junto con CD8 $\alpha\beta$, CD8 $\alpha\alpha$ regula negativamente la activación del complejo CD8 $\alpha\beta$ -TCR:Ag-MHC (Cawton 2001), de forma que en realidad actúa como “correpresor”. Si bien las formas solubles de CD8 $\alpha\alpha$ y CD8 $\alpha\beta$ se unen con igual afinidad a las moléculas MHC de clase I (Kern 1999), cuando el correceptor se expresa en la membrana, el heterodímero CD8 $\alpha\beta$ se une con mucha mayor avidéz que el homodímero CD8 $\alpha\alpha$. Se ha demostrado que para que se produzca este aumento en la avidéz de la unión CD8 $\alpha\beta$ -MHC-I es necesaria la presencia del dominio extracelular completo de CD8 β , incluyendo la región extendida (Witte 1999, Bosselut 2000). Probablemente en CD8 β la menor longitud de su región extendida (Wong 2003) y la modificación regulada de los O-carbohidratos (Moody 2001) produzcan un cambio conformacional que facilite la interacción CD8 $\alpha\beta$ -MHC-I (Figura I.11).

Esto coincide con el hecho de que solamente en la cadena β los O-carbohidratos sufren un proceso de sialización complejo y finamente regulado en función del estadio de maduración de los timocitos y del grado de estimulación del TCR (Moody 2001, Wong 2003).

INTRODUCCIÓN

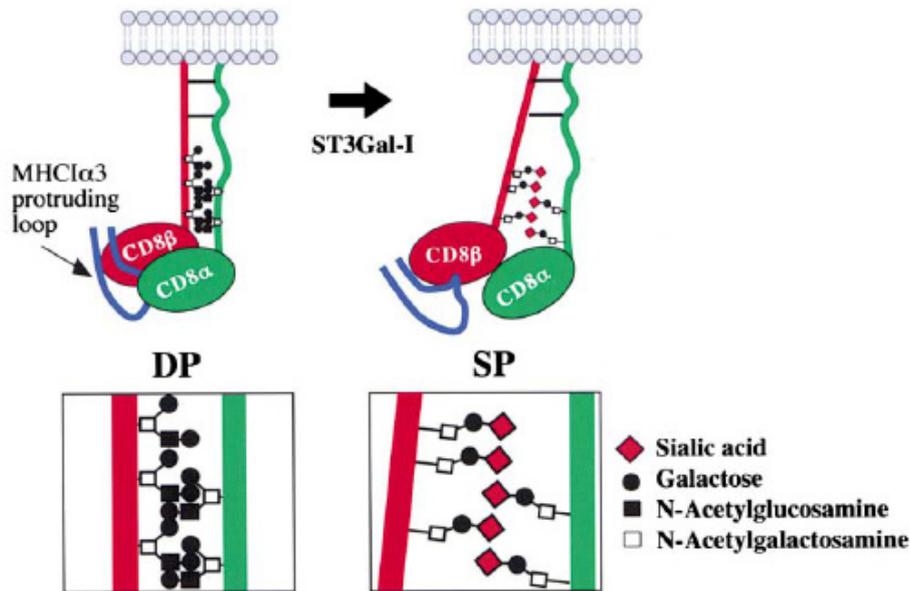


Figura I.11: El heterodímero CD8 $\alpha\beta$ en timocitos DP y CD8 SP. En los timocitos DP la estructura O-glicosídica ramificada y sin residuos de ácido siálico otorga una estructura rígida a los dominios Ig que favorece su interacción con el loop α 3 de las moléculas de MHC-I. Durante la transición de timocitos DP a SP el aumento en la actividad de la sialiltransferasa ST3Gal-I conduce a estructuras O-glicosídicas no ramificadas y con un alto contenido de ácido siálico. La carga negativa de los residuos de ácido siálico produce un alejamiento de las regiones extendidas de ambas cadenas y como consecuencia disminuye la unión a MHC-I. (Moody 2001).

Por otra parte, el reclutamiento del correceptor al interior de las balsas lipídicas es fundamental para su función, ya que es allí donde se produce la mayor asociación a *lck* y se logra la exclusión de la fosfatasa CD45, de forma que la fosforilación de CD3 ζ se traduce en una amplificación de la señal. Se ha demostrado que la subunidad β murina posee un ácido palmítico en la región intracelular que es fundamental para que se produzca el reclutamiento del correceptor a las balsas lipídicas (Arcaro 2000). En humanos, sin embargo, dicho reclutamiento se produciría principalmente gracias a la asociación de las regiones extracelulares de las subunidades α y β (Pang 2007) y a la cola citoplásmica de CD8 β , que al facilitar la unión del correceptor con los componentes intracelulares del complejo TCR/CD3 (CD3 δ), favorecería la asociación TCR-CD3-CD8 dentro de las balsas lipídicas (Doucey 2003, Arcaro 2001, Pang 2007). Tras la activación del linfocito T se produce la internalización de CD8 $\alpha\beta$ junto con el complejo TCR-CD3. Por el contrario, la expresión de CD8 $\alpha\alpha$ aumenta tras la activación, sugiriendo una “desconexión” entre CD8 $\alpha\alpha$ y el complejo TCR-CD3, lo cual concuerda con su exclusión de las balsas lipídicas (Arcaro 2000, Pang 2007).

Por lo tanto, parte del efecto supresor de $CD8\alpha\alpha$ se debería al secuestro de $p56^{lck}$ y LAT fuera de las balsas lipídicas (Gangadharan 2004, Figura I.12), pero también a que $CD8\alpha\alpha$ parece producir una disrupción de las mismas con la consecuente alteración de la asociación $CD8\alpha\beta$ -TCR-CD3 (Cawthon 2002). Una de las funciones fisiológicas de $CD8\alpha\alpha$ como correpressor sería la de permitir la diferenciación de timocitos a linfocitos T $CD8\alpha\alpha$ con TCRs de alta afinidad. Esto ocurriría en la maduración de los linfocitos T CD8 intraepiteliales, que serían eliminados por selección negativa de no mediar la supresión producida por $CD8\alpha\alpha$ (Gangadharan 2006). Por otra parte, y a nivel periférico, la inducción de $CD8\alpha\alpha$ en algunos linfocitos T $CD8\alpha\beta$ efectoros permitiría su supervivencia (disminuyendo su activación) y posterior diferenciación hacia linfocitos T de memoria (Madakamutil 2004).

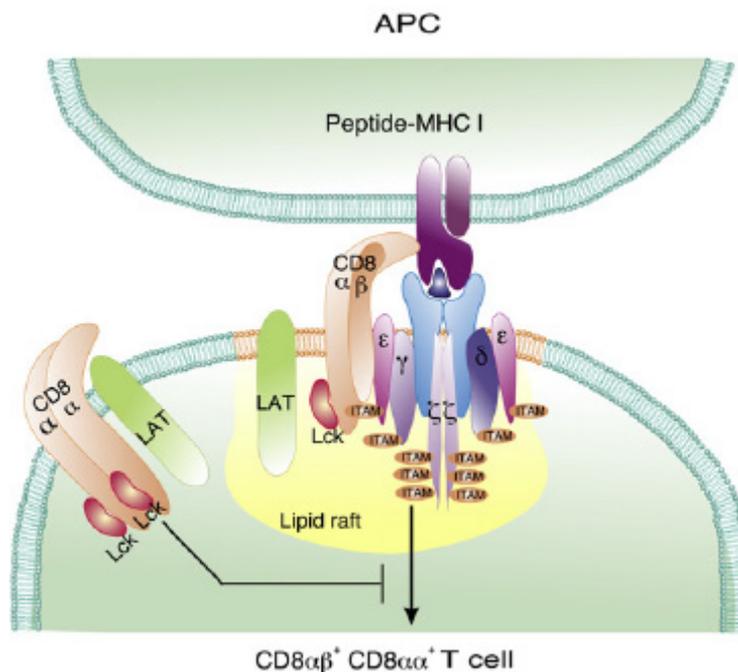


Figura I.12: Función de $CD8\alpha\alpha$ como correpressor. $CD8\alpha\alpha$ es excluido de las balsas lipídicas dónde se encuentra el complejo de activación TCR-CD3 unido a la molécula MHC-I presentadora del péptido. Cuando se forma dicho complejo de activación (ya sea en el contexto de la selección positiva de los timocitos $CD4+CD8\alpha\beta+CD8\alpha\alpha+$ o en linfocitos T $CD8\alpha\beta$ que inducen transitoriamente la expresión de $CD8\alpha\alpha$ durante su activación en la periferia), el correpressor $CD8\alpha\alpha$ secuestraría $p56^{lck}$ y LAT fuera de las balsas lipídicas produciendo una disminución en la señal de activación. (Tomado de Singer 2008).

5.3 Biogénesis

Como la mayoría de las proteínas de secreción y de membrana, las subunidades α y β de CD8 sufren una serie de modificaciones postraduccionales a medida que

INTRODUCCIÓN

avanzan por los distintos compartimentos intracelulares de la ruta de secreción. Son sintetizadas en ribosomas asociados al retículo endoplásmico (RE), y el polipéptido naciente se genera en su interior. Durante su elongación en la luz del RE se producen modificaciones postraduccionales como el agregado de N-carbohidratos y la asistencia en el plegamiento por diversas enzimas y proteínas chaperonas (Vashist 2004). La N-glicosilación de los dominios *IgV-like* de las subunidades de CD8 presenta una alta variabilidad entre distintas especies. En humanos solo la cadena β está N-glicosilada en un único sitio, mientras que en ratas la cadena α presenta un sitio de N-glicosilación y la cadena β presenta 3. En ratones sucede lo contrario: existen 3 sitios de N-glicosilación en la cadena α y 1 en la cadena β (Shore 2006). La secuencia consenso de N-glicosilación es Asn-X-Ser/Thr (X es cualquier aminoácido excepto prolina), aunque no en todos los casos se añade el carbohidrato. Para impedir que las proteínas alcancen su lugar de destino sin la conformación adecuada, el RE dispone de un mecanismo de “control de calidad” (Ellgard 2003), que permite que las proteínas con un plegamiento incorrecto sean degradadas por la vía ERAD (degradación asociada al RE, Kostova 2003).

Los N-carbohidratos son muy importantes en los primeros pasos del plegamiento de muchas glicoproteínas, ya que ellos mismos actúan como chaperonas, pero su principal función es regular el control de calidad durante el ciclo calnexina-calreticulina. Estas lectinas se unen con alta eficiencia a los N-carbohidratos modificados por glucosidasas del RE (Glucosidasa I y Glucosidasa II), y permiten que al aumentar la permanencia de las glicoproteínas en el ciclo Calnexina-Calreticulina el plegamiento sea más lento pero aumente su eficiencia (Cabral 2001, Hebert 2005, Helenius 2004). Si no se consigue un plegamiento correcto, las glicoproteínas son reconocidas por la maquinaria de ERAD y expulsadas al citosol para su posterior degradación (Plempner 1999). Una señal de reconocimiento de ERAD es la eliminación de una de las manosas terminales de los N-carbohidratos por la ER manosidasa I (ERM-I), de forma que la ERM-I actuaría como un “timer” indicando que ha finalizado el plazo de conseguir un plegamiento correcto para la glicoproteína en cuestión (Cabral 2001, Hebert 2005, Helenius 2004) (Figura I.13).

Los niveles basales de la ERM-I son muy bajos debido a que la proteína está sujeta a una proteólisis regulada (Wu 2007). La acumulación de proteínas con una conformación anómala dentro del RE se traduce en una respuesta desde el RE hacia el núcleo celular denominada UPR (*unfolded protein response*)(Ron 2007), que

básicamente consiste en aumentar los niveles de proteínas chaperonas y la eficiencia de la maquinaria de ERAD (Li 2000, Sheuner 2001). Recientemente se ha descrito que algunas de estas proteínas que aumentan como consecuencia de la UPR conducen a la estabilización de la ERM-I al inhibir su proteólisis (Termine 2009), y este parece ser el principal mecanismo por el cual aumenta la eficiencia de ERAD.

Con frecuencia el transporte vesicular desde el RE hacia el aparato de Golgi involucra el reconocimiento de “señales de exportación” del RE presentes en el extremo citoplasmático de la proteína (Barlowe 2003, Lee 2004). Se ha demostrado que la valina carboxi-terminal de CD8 α interviene en el transporte de la glicoproteína desde el RE hacia el compartimento intermedio (Iodice 2001). En ciertas proteínas con una conformación anómala estas señales de exportación harían que la maquinaria de salida del RE compita con la maquinaria ERAD, explicando así que un porcentaje considerable de estas proteínas anómalas alcancen la membrana celular o resulten secretadas (Kinkaid 2006).

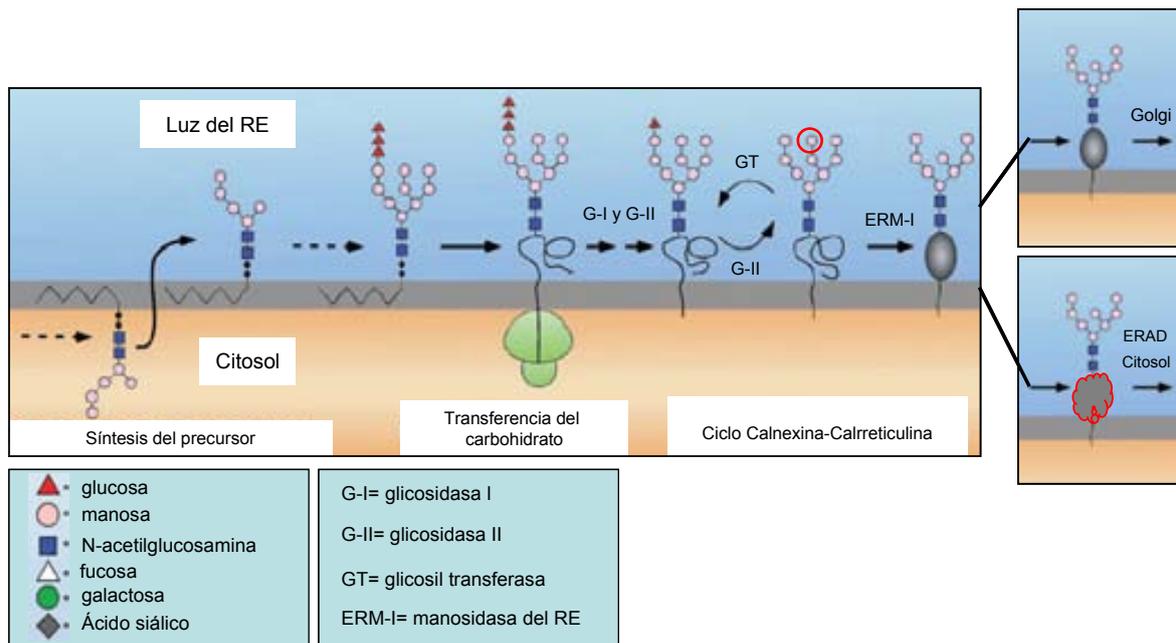


Figura I.13: Biosíntesis y procesamiento de los N-carbohidratos. Una vez se produce la transferencia del oligosacáridos al residuo de asparagina del polipéptido, se produce la eliminación sucesiva de dos residuos de glucosa por acción de la G-I y la G-II del RE. La estructura resultante ingresa al ciclo Calnexina-Calreticulina, dos lectinas que en combinación con otras proteínas asisten el proceso de plegamiento y formación de confórmeros de las proteínas. El ciclo se mantiene por sucesivas glicosilaciones (GT) y eliminaciones del residuo de glucosa remanente (G-II) hasta que se alcanza la conformación adecuada. Si esto no sucede, la ERM-I cataliza la eliminación de un residuo de manosa (resaltado con rojo en la Figura) y la proteína anómala (también resaltada en rojo) se convierte en diana de la maquinaria de ERAD (Adaptado de Helenius 2001).

INTRODUCCIÓN

A diferencia del RE, el complejo de Golgi carece de un sistema riguroso de control de la fidelidad del proceso de biosíntesis. Las proteínas van siendo modificadas a medida que se mueven desde el *cis*-Golgi hacia el *trans*-Golgi (Palade 1975). El proceso de O-glicosilación de CD8 α , que ha sido estudiado en detalle, comienza en el complejo *cis*-Golgi por agregados de GlcNAc a residuos de serina o treonina. El polipéptido sin glicosilar tiene un patrón de migración de 27 KDa en condiciones reductoras, mientras que la forma de glicosilación intermedia migra a 29 KDa, pero tiene una vida media inferior a 15 minutos. En el *trans*-Golgi continúa la adición de Gal, GlcNAc, GalNAc, mucosa y ácido siálico (Pascale 1992), incrementándose el patrón de migración hasta los 32-34 KDa. Esta forma madura es la que continúa el tránsito hacia la membrana celular. Como se describió en el apartado anterior, la regulación del proceso de O-glicosilación de la región extendida de las subunidades de CD8, especialmente de la cadena β , juega un papel muy importante en la función del correceptor.

6. Inmunodeficiencias primarias

Las inmunodeficiencias primarias son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que afectan a distintos componentes de la inmunidad innata y adaptativa. Aunque la característica principal de las inmunodeficiencias primarias es una susceptibilidad incrementada a contraer infecciones, con gran frecuencia también se asocian a neoplasias y enfermedades autoinmunes.

La clasificación de las inmunodeficiencias primarias es compleja debido al gran número de entidades diferenciadas que se conocen (más de 150) y que pueden agruparse según distintos criterios: moleculares, clínicos, fenotípicos, patrón de herencia, etc. Puesto que las inmunodeficiencias primarias representan una oportunidad única para comprender el funcionamiento y la regulación del sistema inmune en humanos, un criterio de clasificación muy útil se basa en el mecanismo inmune que resulta afectado (Geha 2007 - IUIS Committee for PID Classification).

Se engloban como **Inmunodeficiencias Combinadas** aquellas que afectan tanto a las células T como a las células B. Cuando la afectación involucra a componentes imprescindibles para el desarrollo o la función de los linfocitos T y B (o de los linfocitos T y como consecuencia de la función de los linfocitos B), se produce una inmunodeficiencia severa combinada o SCID. Por ejemplo, los defectos en RAG1,

RAG2, Artemis, DNA Ligasa, cadena γ común, IL-7R α , JAK3, CD45, CD3, ADA, PNP y CIITA (y otras moléculas que producen deficiencia de MHC-II), conducen a SCID. Curiosamente, distintas mutaciones en el mismo componente del sistema inmune pueden llevar a diferentes entidades clínicas. En este sentido, las mutaciones hipomórficas en RAG1, RAG2 y Artemis llevan al Síndrome de Omenn, una inmunodeficiencia extremadamente grave que se caracteriza por una infiltración de diversos órganos por linfocitos autorreactivos. Otras veces el defecto tiene un menor impacto en el desarrollo o la función de los linfocitos, y conduce a una inmunodeficiencia combinada menos severa que en los casos anteriores. Se han incluido en este subgrupo los defectos en TAP1, TAP2 y Tapasina (causantes de la deficiencia de MHC-I), en CD40 y CD40L (causantes del Síndrome de hiper IgM), en el correceptor CD8, en ZAP-70, en IL2-R α , en p56^{lck} y en algunos componentes del complejo CD3 (CD3 γ).

Las alteraciones que afectan principalmente a la producción de anticuerpos se engloban dentro de las **Inmunodeficiencias Humorales**. La agamaglobulinemia ligada al cromosoma X es una de las inmunodeficiencias mejor caracterizadas y se debe a defectos en BTK. Otros defectos producen deficiencias selectivas para algún subtipo de inmunoglobulina, y en un subgrupo muy extenso y clínicamente heterogéneo, denominado inmunodeficiencia común variable, no se conoce el defecto molecular en la mayoría de los casos (unos pocos casos han sido atribuidos a defectos en ICOS, TACI, CD19 y BAFF). En otro subtipo de inmunodeficiencias humorales la alteración radica principalmente en el proceso de recombinación durante el cambio de isotipo y en la hipermutación somática (AID y UNG), o en la vía de estimulación del cambio de isotipo (deficiencia de CD40L y CD40).

En otro grupo de inmunodeficiencias se produce principalmente una **desregulación del sistema inmune** que conduce a enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, en la poliendocrinopatía autoinmune con candidiasis y distrofia ectodérmica (APECED) está afectado el factor de transcripción de expresión tímica AIRE, por lo que existe una afectación del proceso de “educación tímica”, y como consecuencia no se eliminan los timocitos potencialmente autorreactivos. Asimismo, la caracterización de los defectos en Foxp3 como causantes del IPEX (inmunodeficiencia/desregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al cromosoma X) demostró que las células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ son fundamentales en el control activo de la tolerancia, y que la eliminación de los timocitos autorreactivos en el timo no es

INTRODUCCIÓN

suficiente para asegurar el equilibrio del sistema inmune. Otra entidad que se asocia prácticamente en todos los casos con fenómenos autoinmunes es el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune o ALPS, que se caracteriza por una alteración de la vía apoptótica de los linfocitos mediada por Fas y como consecuencia, se acumularían linfocitos T y B autorreactivos. Las inmunodeficiencias que afectan la función de las células citotóxicas también conducen a una desregulación muy importante del sistema inmune. La Linfohistiocitosis Hemofagocítica Familiar o FHL puede estar causada por una deficiencia de perforina o de proteínas implicadas en la secreción de los gránulos citotóxicos, y se caracteriza por una infiltración de diversos órganos por linfocitos T y macrófagos activados. Algunas proteínas del mecanismo de secreción regulada son comunes a otros tipos celulares (melanocitos, neuronas), de forma que su afectación se asocia a otros trastornos además de la linfohistiocitosis, como por ejemplo albinismo parcial y trastornos neurológicos (Síndrome de Griscelli y Síndrome de Chediak-Higashi).

Cada vez se conoce un número mayor de **inmunodeficiencias que afectan a la inmunidad innata**. Entre los defectos de la función fagocítica se incluyen la enfermedad granulomatosa crónica, los defectos en la adhesión leucocitaria, el Síndrome de Shwachman Diamond, y las neutropenias congénitas. Asimismo, se han identificado alteraciones en una gran cantidad de receptores y componentes de la vía de señalización de la inmunidad innata: IFN- γ R, IL-12R β 1, IL-12p40, STAT1, STAT5, IRAK4, IKKB, NF κ B, CXCR4. Los defectos en los componentes de la vía clásica del complemento (C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 y C9) también producen alteraciones del sistema inmune, que en muchos casos se manifiestan como enfermedades autoinmunes. Por último, también se han descrito inmunodeficiencias producidas por defectos en la vía alternativa del complemento.

Es evidente que el criterio de clasificación de las inmunodeficiencias basado en el aspecto funcional del sistema inmune admite diferentes posibilidades. Para tener una visión más completa y global de la función del eje citotóxico y su regulación, a continuación se describen con mayor profundidad las principales inmunodeficiencias que afectan a los linfocitos T CD8 $^{+}$ y a las células NKs, y que en la clasificación que se describió anteriormente se encuentran incluidas en dos grupos distintos: inmunodeficiencias combinadas y desregulación del sistema inmune.

7. Inmunodeficiencias primarias que afectan el eje citotóxico

Los defectos en los componentes de las células citotóxicas pueden afectar a moléculas que participan en distintas fases de la respuesta inmune. La fase aferente involucra el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T CD8, mientras que la fase eferente concierne a la respuesta efectora de las células citotóxicas, y en este caso estarían incluidos tanto los linfocitos T CD8 como las células NKs.

7.1 Inmunodeficiencias que afectan el reconocimiento antigénico

7.1.1 Deficiencia de CD8

Los linfocitos T CD8 reconocen péptidos unidos a las moléculas MHC de clase I. El correceptor CD8 aumenta la afinidad de la unión del TCR al complejo pMHC-I, y aumenta la señalización del TCR al unir p56^{lck} en su cola citoplasmática. Como se describió anteriormente, los modelos murinos CD8^{-/-} han demostrado que el correceptor juega un papel muy importante en el proceso de selección tímica de los linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, los pacientes deficientes en CD8 no parecen mostrar un aumento exagerado de la susceptibilidad a desarrollar infecciones virales. En este sentido, el estudio de los pacientes con Déficit Familiar de CD8 puede ayudar a dilucidar el papel de CD8 en la maduración y la función de los linfocitos T citotóxicos en humanos.

7.1.1.1 Manifestaciones clínicas

Solo se han descrito 4 individuos con Deficiencia Familiar de CD8 en dos familias no relacionadas de la península ibérica. Ambas familias son de etnia gitana y presentan consanguinidad. Las manifestaciones clínicas son infecciones respiratorias de repetición, con un grado de afectación muy variable. Uno de los pacientes desarrolló bronquiectasias diseminadas que evolucionaron a una insuficiencia respiratoria severa, mientras que sus dos hermanas hasta el momento son asintomáticas (de la Calle-Martín 2001). La única paciente perteneciente a la segunda familia desarrolló bronquiectasias como consecuencia de los sucesivos cuadros infecciosos del tracto respiratorio, aunque en forma menos diseminada que el primer paciente descrito (Mancebo 2008).

INTRODUCCIÓN

7.1.1.2 Hallazgos de laboratorio

Los pacientes presentan altos títulos de anticuerpos contra una gran diversidad de virus (CMV, Herpes zoster, EBV, rubeola) como así también contra otros gérmenes y antígenos (toxoides tetánico, toxoplasma, *Mycoplasma pneumoniae*). En el paciente con mayor afectación pulmonar el cultivo de esputo fue positivo para *Haemophilus influenzae* en una ocasión y para *Pseudomonas aeruginosa* en varias ocasiones. Los valores séricos de inmunoglobulina incluyendo las subclases de IgG y la proliferación linfocitaria son normales en todos los casos. Las subpoblaciones linfocitarias también son normales, excepto por una ausencia total de CD8 en linfocitos T y en células NKs. Como consecuencia los pacientes también presentan un número elevado de linfocitos T DN, que representarían una población particular de células T citotóxicas.

7.1.1.3 Defecto molecular

Todos los pacientes presentan una sustitución de una G por una A en el nucleótido 331 (331G>A) del gen *CD8A*, que conduce al cambio de la glicina 111 por serina (Gly111Ser) en el dominio inmunoglobulina de CD8 α . La correlación entre dicha mutación y la falta de expresión de CD8 se estableció mediante experimentos de transfección de CD8Ser111 (de la Calle-Martín 2001).

7.1.1.4 Aspectos funcionales

La respuesta inmune en los pacientes deficientes en CD8 es lo suficientemente competente como para permitir la resolución de las infecciones virales. Probablemente las células NKs, los linfocitos T CD4 y los anticuerpos antivirales compensen parcialmente la ausencia y/o la disfunción de los linfocitos citotóxicos. Sin embargo, también existe la posibilidad de que los linfocitos T DN de los pacientes sean en realidad linfocitos del linaje citotóxico que aún en ausencia de CD8 hayan superado la selección positiva en el timo y colaboren en la defensa antiviral y antitumoral. Avalan esta hipótesis el hecho de que en el primer paciente estudiado los linfocitos T DN presenten un fenotipo compatible con linfocitos T citotóxicos. Como se comentó anteriormente, los modelos murinos CD8^{-/-} demuestran que si bien el correceptor CD8 aumenta la eficiencia del proceso de selección positiva de los timocitos restringidos para MHC-I, algunos timocitos con TCRs de alta afinidad por el ligando son capaces de madurar en ausencia del correceptor y de mantener su función efectora una vez

diferenciados a linfocitos T del linaje citotóxico. Un aspecto importante y pendiente de esclarecer es, si al igual que sucede en el modelo murino, la ausencia de CD8 en humanos es compatible con la existencia de linfocitos T específicos de virus restringidos para HLA-I y con la función efectora conservada.

7.1.2 Deficiencia de HLA-I (Síndrome del Linfocito Desnudo tipo I)

Las moléculas HLA de clase I participan en la respuesta inmune contra patógenos intracelulares y células tumorales, ya que presentan a los linfocitos T citotóxicos los péptidos derivados de proteínas que se sintetizan en la célula. De esta forma las moléculas de HLA-I parecerían, a simple vista, fundamentales para la defensa antiviral y antitumoral. Sin embargo, existen casos estudiados de niños y adultos con un defecto en la expresión de HLA-I que no parecen tener una susceptibilidad importante a desarrollar infecciones virales ni neoplasias. Los bajos niveles de expresión de las moléculas de clase I imposibilitan el tipaje por métodos serológicos, por lo que a la deficiencia de HLA-I también se la llamó síndrome del linfocito desnudo tipo I (BLS-I). No se ha reportado ningún caso con una deficiencia completa de HLA-I, indicando que bajos niveles de expresión podrían ser suficientes para sustentar la respuesta inmune, mientras que un déficit total de HLA-I sería incompatible con la vida. Existen solamente una veintena de casos bien caracterizados de deficiencia de HLA-I (Zimmer 2005, Gadola 2000).

7.1.2.1 Manifestaciones clínicas

Al contrario de lo que sucede en los casos de deficiencia de HLA-II (BLS-II), que se caracterizan por un inicio temprano y una clínica de inmunodeficiencia severa combinada, los casos de BLS-I suelen ser asintomáticos durante los primeros años de vida. Los pacientes suelen comenzar a tener infecciones respiratorias crónicas antes de los 10 años de edad, debidas principalmente a *Haemophilus influenzae* y a otras bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella sp* y *Pseudomona aeruginosa*. El cuadro evoluciona a una insuficiencia respiratoria como consecuencia de bronquiectasias, enfisemas, panbronquiolitis u obstrucción bronquial (Sugiyama 1986, Teisserenc 1997, de la Salle 1994, Donato 1995). Más de la mitad de los casos también presentan lesiones en la piel que comienzan como una inflamación local,

INTRODUCCIÓN

principalmente en las piernas, y evolucionan a granulomas necrotizantes (Moins-Teisserenc 1999, Villa-Forte 2008, Gadola 2000).

7.1.2.2 Defectos moleculares

Se han identificado tres tipos de defectos que producen deficiencia de HLA-I. El mecanismo por el cual los defectos moleculares caracterizados conducen a una deficiencia de HLA-I se explica en el apartado 4.1.1.

1-Disminución en la expresión constitutiva de HLA-I. El defecto genético no ha sido identificado. El hecho de que los dos hermanos con este tipo de BSL-I (Payne 1983) posean distintos haplotipos HLA, indica que la alteración no estaría asociada al cromosoma 6. Los niveles de expresión de HLA-I se encuentran 10 veces disminuidos respecto de los individuos control. Sin embargo, la estimulación con TNF- α , IFN- α , o IFN- γ produce una inducción de los genes de HLA-I en los linfocitos T. Estos aumentos en la expresión de HLA-I en respuesta a citocinas inflamatorias podrían compensar los requerimientos de la respuesta inmune, ya que los sujetos son asintomáticos.

2-Defectos en TAP1 o TAP2. (de la Salle 1999, Furukawa 1999, Moins-Teisserenc 1999, Matamoros 2001, de la Salle 2002). Los pacientes con este defecto suelen ser hijos de padres consanguíneos y son homocigotos para el locus HLA, concordando con el hecho de que el defecto se encuentra en el cromosoma 6. Los genes que codifican para las subunidades TAP se localizan dentro del complejo MHC-II. Se han descrito 6 polimorfismos en TAP1 y 4 en TAP2, aunque no parece existir ninguna relación entre dichos polimorfismos y la capacidad funcional del complejo TAP. Se han caracterizado 5 mutaciones en TAP1 y 5 en TAP2, y todas generan subunidades truncadas (codón stop) afectando generalmente los dominios transmembrana, aunque también se ha descrito una mutación en TAP2 que afecta al sitio de unión al ATP (de la Salle 2002).

3-Defectos en tapasina. Solo se ha descrito un caso con una mutación en tapasina en homocigosis en un individuo que no presenta las manifestaciones típicas de lesiones granulomatosas e infecciones respiratorias, probablemente debido a que solo presenta una disminución moderada de las moléculas HLA-I. El gen *Tapasina* se localiza dentro del complejo MHC, por este motivo el paciente deficiente en tapasina, a pesar de no provenir de padres consanguíneos, es homocigoto para el locus HLA (Yabe 2002).

7.1.2.3 Aspectos funcionales

Linfocitos T CD8

Puesto que la selección positiva de los linfocitos T que se diferencian al linaje CD8 depende de la interacción con las moléculas HLA-I (según lo demuestran los experimentos con ratones transgénicos), sería lógico pensar que la baja expresión de HLA-I afectaría dicho proceso de selección. Como hemos visto anteriormente, los ratones deficientes para MHC-I tienen un número muy bajo de linfocitos T CD8 (Van Kaer 1992). Sin embargo, en humanos solo en algunos pacientes con BLS-I (generalmente jóvenes) se observa una disminución del cociente CD4/CD8, sugiriendo que el proceso de selección positiva del linaje CD8 es menos dependiente de la interacción con HLA-I que en ratones. Otra posibilidad, y que no excluye la anterior, es que en los pacientes adultos exista una fuerte expansión periférica de los linfocitos T $\alpha\beta$ CD8+ (de la Salle 1994).

En algunos casos se ha identificado una respuesta antiviral específica restringida para HLA-I (de la Salle 1997, de la Salle 2002). Por lo tanto algunos linfocitos TCR $\alpha\beta$ CD8+ pueden reconocer antígenos presentados por las moléculas HLA-I en forma independiente de TAP, contribuyendo a la respuesta antiviral. Diversos trabajos han demostrado que tanto proteínas citosólicas como péptidos ya procesados pueden ingresar al RE en forma independiente de TAP (Lee 1996, Johnstone and Del Val 2007). Algunas proteínas antigénicas secretorias (que poseen péptido señal) ingresan mediante translocación cotraduccional, y una vez que el péptido señal ha sido escindido puede unirse a las moléculas MHC-I y ser presentado. Asimismo, las proteínas pueden ser procesadas por proteasas del trans-Golgi como la furina, o por proteasas endosomales, como catepsinas, y los péptidos resultantes pueden unirse a las moléculas MHC-I dentro de estos compartimentos. Por otra parte, aunque los mecanismos implicados aún no se conocen con exactitud, existen evidencias de que también existiría una traslocación de péptidos procesados al RE independiente de TAP.

Se ha reportado un aumento de linfocitos T $\gamma\delta$ en algunos pacientes deficientes en TAP con una historia reciente de inflamación, que luego retornan a valores normales tras la remisión, y que expresan con mayor frecuencia cadenas V δ 1 (Moins-Teisserenc 1999, de la Salle 2002, Matamoros 2001). Estos linfocitos normalmente participan en respuestas contra el CMV y en respuestas restringidas para CD1, independientes de TAP. Muchos de estos clones muestran citotoxicidad contra células

INTRODUCCIÓN

autólogas, probablemente debido a que los receptores inhibidores específicos de HLA-I no pueden ser eficientemente reclutados. Apoyan esta teoría la presencia de linfocitos T $\gamma\delta$, principalmente $V\delta 1$, en las lesiones granulomatosas de la piel en un paciente deficiente en TAP (Moins-Teisserenc 1999).

Células NKs

La deficiencia en células NKs conduce a infecciones severas por HSV y CMV (Biron 1989, Orange 2002), indicando que estas células son fundamentales en la respuesta antiviral. Los pacientes deficientes en TAP no presentan este tipo de infecciones, lo cual sugiere que en estos pacientes la función de las células NKs está bastante conservada. La actividad citotóxica de las células NKs normalmente está controlada por un balance entre receptores activadores, cuyos ligandos no son bien conocidos, y receptores inhibidores, que reconocen moléculas HLA-I en la célula diana. El estudio de los modelos murinos de deficiencia de MHC-I (Liao 1991, Dorfman 1997) mostró que existe una “compensación a la baja” de las señales estimuladoras para favorecer la tolerancia. En humanos existiría un mecanismo de compensación similar, ya que las células NKs no estimuladas de pacientes deficientes en TAP tienen una actividad citolítica disminuída contra las células K562 deficientes en HLA-I (Zimmer 1998). La mayoría de las células NKs activadas TAP^{-/-} expresan el receptor inhibidor CEA-CAM1, mientras que una proporción muy baja de células NKs normales expresan dicho receptor (Markel 2004, Vitale 2002). Sin embargo, tras la activación *in vitro* con IL-2, la capacidad de las células NKs TAP^{-/-} para lisar las células diana K562 es similar a la lisis producida por las células NKs de individuos control. Las células NKs policlonales activadas TAP⁻ muestran el mismo espectro de citotoxicidad que las células TAP⁺, pero a diferencia de estas, muestran citotoxicidad contra células autólogas, como linfocitos B transformados por EBV+ y fibroblastos de la piel (Zimmer 1998). Por tanto, parece que las células NKs TAP^{-/-} son capaces de reaccionar a las citocinas que se liberan durante la respuesta inflamatoria contribuyendo a la defensa inmunológica. Sin embargo, debido a la baja expresión de moléculas HLA-I que expresan las células autólogas, las células NKs TAP⁻ no podrían ser reguladas adecuadamente por sus receptores inhibidores y podrían, potencialmente, producir reacciones patológicas.

La molécula HLA-E, una molécula MHC clase I no clásica, juega un papel importante como censor de la ruta biosintética de las moléculas HLA-I clásicas, ya que presenta péptidos derivados de la secuencia señal de dichas moléculas en forma

dependiente de TAP. Las células NKs y un subset de linfocitos T poseen receptores NKG2A/CD94 que interaccionan con las moléculas HLA-E y suprimen la respuesta citolítica y la liberación de citocinas. En los pacientes deficientes en TAP, la falta de expresión de las moléculas HLA-E (Matamoros 2001) podría favorecer el aumento en la citotoxicidad de células autólogas que se observa en los tejidos inflamados.

Respuesta humoral

Los pacientes deficientes en TAP poseen altos títulos de anticuerpos contra la mayoría de los virus más conocidos como sarampión, influenza, parotiditis, herpes simple, CMV, varicela y EBV (Donato 1995). Puesto que las infecciones virales no conducen a una patología exagerada ni requieren de un cuidado especial, la respuesta humoral parece ser crucial en estos pacientes.

7.2 Inmunodeficiencias que afectan a la función efectora de los linfocitos citotóxicos

7.2.1 Alteraciones de la vía de secreción de gránulos citotóxicos

Muchas enfermedades hereditarias del sistema inmune tienen en común un síndrome que se caracteriza por un estado de activación de linfocitos T y macrófagos llamado Síndrome de Linfocitosis Hemofagocítica (HLH). Generalmente el HLH se produce como consecuencia de una infección por CMV o EBV, y se caracteriza por una infiltración de diversos órganos por linfocitos T policlonales activados y macrófagos activados que fagocitan glóbulos rojos y otras células sanguíneas. Se han identificado diversas enfermedades del sistema inmune que cursan con HLH: las Linfocitosis Hemofagocíticas Familiares (FHL), el Síndrome de Griscelli (GS), el Síndrome de Chediak-Higashi (CHS), el Síndrome de Hermansky-Pudlak tipo II, y el Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP) (Dufourcq-Lagelouse 1999, Enders 2006). El HLH también puede ser secundario a infecciones severas en personas inmunodeprimidas o a enfermedades malignas. Sin embargo, un rasgo muy característico de los pacientes que cursan con HLH primaria es la ausencia de actividad NK (y actividad citolítica en general) durante todo el transcurso de la enfermedad (Sullivan 1998).

INTRODUCCIÓN

7.2.1.1 Manifestaciones clínicas

En los pacientes con FHL, los síntomas del HLH, que casi siempre se produce tras una infección viral, suelen comenzar como fiebre muy elevada y hepatoesplenomegalia. A continuación es frecuente que se produzca palidez, vómitos, anorexia, irritabilidad y eritemas. En fases más avanzadas, y secundario al HLH, suele haber afectación del SNC (convulsiones, ataxia, hemiplejía, aumento de la presión intracraneal).

El Síndrome de Griscelli (SG tipo I y tipo II) y el Síndrome de Chediak-Higashi (CHS) se caracterizan por albinismo parcial (Griscelli 1978, Klein 1974, Stegmaier 1965). En el SG tipo I se producen desde el nacimiento síntomas neurológicos, principalmente falta de coordinación de los movimientos voluntarios (Sanal 2002). En el CHS frecuentemente se producen manifestaciones neurológicas primarias (convulsiones, disminución progresiva del coeficiente intelectual, neuropatía periférica progresiva). En cambio, en el SG tipo II no existe una alteración primaria del sistema nervioso, a pesar de que como consecuencia del HLH puede haber una afectación del SNC, como se comentó anteriormente para los casos de FHL. La mayoría de los pacientes con SG y CHS, desarrollan cuadros recurrentes de HLH en la llamada “fase acelerada” de la enfermedad. También se ha descrito una presentación clínica de HLH en Síndrome de Hermansky-Pudlak tipo II, que también cursa con pseudoalbinismo (Enders 2006).

7.2.1.2 Defectos moleculares

Se han identificado 4 loci asociados a FHL: 9q21 (FHL1), 10q21 (FHL2), 17q25 (FHL3), y 6q24.2 (FHL4). Aún no ha sido identificado el gen causante de FHL1, mientras que los genes que codifican para perforina, hMunc13-4, y Syntaxin-11 se han asociado a FHL2 (Steep 1999), FHL3 (Feldmann 2003) y FHL4 (zur Stadt 2005), respectivamente.

El Síndrome de Griscelli (GS) también está asociado a varios loci. En el caso del GS tipo I y el GS tipo II, ambos loci se ubican en la misma región cromosómica 15q21. Las mutaciones en el gen que codifica para la miosina Va son causantes de GSI (Pastural 2000), mientras que las mutaciones en el gen que codifica para Rab27a causan GSII (Ménasché 2000). La Miosina Va, implicada en el transporte vesicular celular, es especialmente abundante en las neuronas y en los melanocitos, por lo que los pacientes con GSI presentan alteraciones neurológicas primarias, además de albinismo parcial, pero no presentan HLH. Rab27A, se expresa en melanocitos,

leucocitos, plaquetas y células de otros tejidos, pero no en el cerebro. Esto explica que los pacientes con SG tipo II no presenten alteraciones neurológicas primarias, aunque sí pueden presentar daños neurológicos secundarios a los cuadros de hemofagocitosis. El GSIII está causado por mutaciones en el gen que codifica para la melanofilina (Ménasché 2003), que se expresa específicamente en los melanocitos, de forma que el único signo de la enfermedad es la hipopigmentación de la piel y el vello corporal.

El gen que se encuentra afectado en el Síndrome de Chediak-Higashi (CHS) es *LYST* (Barbosa 1996), localizado en la región cromosómica 1q42-q43. Es un gen muy extenso de 55 exones que codifica para una proteína que parece estar implicada en el tráfico proteico de las organelas (Tchernev 2002). Se observan cuerpos de inclusión gigantes en todas las células que tienen lisosomas, melanosomas y gránulos de secreción (Spritz 1998, Shiflett 2002, Ward 2002), por lo que parece estar afectado un paso común necesario para la maduración de estas organelas intracelulares.

El Síndrome de Hermansky-Pudlak tipo II está asociado a mutaciones en el gen *APB3* (Dell'Angelica 1999).

7.2.1.3 Aspectos funcionales

La vía citotóxica dependiente de la liberación de gránulos es un proceso que involucra varios pasos, que incluyen el reconocimiento de la célula diana por la célula citotóxica, la formación de la sinapsis entre ambas células, la polarización de los gránulos líticos hacia la zona de contacto con la célula diana y la secreción del contenido de los gránulos de perforina, que en última instancia conduce a la lisis de la célula diana. Por ello una alteración en cualquiera de estos pasos produce un defecto en la actividad citotóxica. Los ratones deficientes en perforina (Kagi 1994) permitieron corroborar la hipótesis de que el mecanismo citotóxico mediado por la liberación de gránulos es fundamental para el control de las infecciones víricas, y estudiar los mecanismos por los cuales la falta de citotoxicidad lleva a una disregulación tan severa del sistema inmune. La falta de depuración del antígeno en ausencia de actividad citolítica provocaría un aumento del tiempo de contacto entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno APC, que rescataría a las células activadas de la muerte celular inducida por activación (AICD) (Jordan 2004). Estos linfocitos T activados (principalmente CD8) producen grandes cantidades de IFN- γ y, por lo tanto, una activación de los macrófagos. A su vez los macrófagos producen TNF- α , IL-1, e IL-6, produciéndose un cuadro inflamatorio generalizado con daño tisular (Rosi 1998, Kagi

INTRODUCCIÓN

1999). Dicho cuadro, que generalmente se produce después de una infección por CMV o EBV, se denominó Síndrome de Linfocitosis Hemofagocítica (HLH).

7.2.1.4 Tratamiento

Sin tratamiento, las enfermedades que cursan con HLH suelen ser fatales a corto plazo. El tratamiento farmacológico actual se basa en el protocolo HLH-2004 (Henter 2007) que consiste en la administración conjunta de etopósido, dexametasona y ciclosporina A. A pesar de que se consiguen remisiones de los cuadros de HLH con este tratamiento, muchas veces no se logra un control adecuado. El único tratamiento curativo es el trasplante alogénico de médula ósea (Fisher 1986, Jabado 1997). La implantación parcial (hasta un 20%) es compatible con remisiones a largo término (Landman-Parker 1993).

7.2.2 Alteración de la vía Fas/FasL

La descripción de niños con cuadros de hiperplasia linfoide y enfermedad autoinmune (Sneller 1992) y el hallazgo de defectos en Fas en los ratones *lpr* (Nagata 1995) permitió conocer la relevancia que tiene la vía apoptótica dependiente de Fas en la patología humana que ahora se denomina Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune o ALPS (Rieux-Laucat 1995, Fisher 1995). Desde entonces el número de casos de ALPS bien documentados ha aumentado considerablemente, y se han encontrado defectos en otros componentes de la vía de apoptosis.

7.2.2.1 Manifestaciones clínicas y criterios diagnósticos

La enfermedad suele manifestarse desde los primeros años de vida. Todos los casos cursan con linfoproliferación, que casi siempre está asociada a linfadenopatías y esplenomegalia, y muchas veces también a hepatomegalia. Las enfermedades autoinmunes más frecuentes son anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica, y neutropenia. Con mucha menor frecuencia se han reportado casos que cursan con hepatitis, cirrosis biliar, neuritis óptica, uveítis, escleriditis, tiroiditis, hipotiroidismo, glomerulonefritis, encefalomiелitis y polineurorradiculitis (Rieux-Laucat 2003, Sneller 2003).

El ALPS se define como una alteración en la apoptosis de los linfocitos, que puede corroborarse mediante ensayos *in vitro*, que incluye linfadenopatía y/o

esplenomegalia no malignas y una expansión de linfocitos T CD4⁻CD8⁻ (dobles negativos, DN). Apoyan el diagnóstico los fenómenos autoinmunes que suelen aparecer prácticamente en todos los casos durante el curso de la enfermedad, y la historia familiar, consistente con una alteración autosómica dominante en la mayoría de los casos, aunque con penetrancia variable. Generalmente el diagnóstico se confirma por el hallazgo de una alteración genética, como se describe a continuación.

7.2.2.2 Hallazgos de laboratorio

Suele existir una linfocitosis (B y T) absoluta en los pacientes con ALPS, aunque a veces es relativa debido a una neutropenia asociada. Prácticamente en la totalidad de los pacientes se observa un porcentaje aumentado de linfocitos T $\alpha\beta$ DN (Bleesing 2001, Primary Immunodeficiency Diseases. 2nd Edition), en un rango que suele oscilar entre el 4 y el 40% del total de linfocitos CD3⁺ (el valor normal de células DNs es inferior al 1%). El porcentaje de linfocitos B suele estar incrementado, y también es frecuente observar una inversión del cociente CD4/CD8 en los pacientes con ALPS. Existe un aumento de linfocitos T HLA-DR⁺ y CD57⁺, principalmente CD8⁺. Es bastante característico en los pacientes con ALPS un perfil de citocinas Th2, observándose un aumento de la producción *in vitro* de IL-4, IL-5 e IL-10, y una disminución de IL-12, IL-2 e IFN- γ (Fuss 1997). Asimismo, los valores séricos de IL-10 se encuentran muy elevados en algunos pacientes. También es muy frecuente observar una elevación considerable de IgG e IgA en el suero de los pacientes.

7.2.2.3 Bases moleculares

Se han encontrado mutaciones asociadas a ALPS en Fas, el ligando de Fas (FasL), caspasa-8 y caspasa-10. Fas (TNFSFR6) es el sexto miembro descrito de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFSFR). Son proteínas de membrana tipo I que contienen un número variable de dominios extracelulares conservados ricos en cisteína (CRD). Fas y TNFSFR1A poseen además una región intracelular homóloga de 70 aminoácidos llamada “dominio muerte” porque alrededor de él se ensambla el complejo DISC (*death-inducing signal complex*). FasL (TNFLSF6) pertenece a la superfamilia de ligandos del receptor del factor de necrosis tumoral, y se expresa en dos formas: de membrana y soluble. Antes de la unión al ligando, las cadenas de Fas se asocian en un trímero mediante dominios de asociación presentes

INTRODUCCIÓN

en el primer CRD. La forma funcional de FasL también es un homotrímero. En el apartado 4.1.3.2 se describe la vía de señalización mediada por Fas que culmina con la activación de los efectores del programa de apoptosis.

De acuerdo al genotipo, el ALPS puede clasificarse de la siguiente forma (Oliveira 2008):

- 1- ALPS tipo 0, mutaciones en homocigosis en el gen *TNFRSF6*, que codifica para Fas.
- 2- ALPS tipo Ia, mutaciones en heterocigosis en el gen *TNFRSF6*, que codifica para Fas.
- 3- ALPS tipo Ib, mutaciones en el gen *TNFSF6*, que codifica para FasL.
- 4- ALPS tipo Im (“mosaicismo”), mutaciones somáticas en el gen *TNFRSF6*, que codifica para Fas.
- 5- ALPS tipo II, mutaciones en los genes *CASP10*, *CASP8*, que codifican para la caspasa-10 y la caspasa-8.
- 6- ALPS tipo III, no se conoce el gen afectado.
- 7- ALPS tipo IV, defectos en la vía intrínseca (mutaciones en *NRAS*).

Los pacientes que tienen mutaciones en Fas en homocigosis tienen una forma de ALPS muy agresiva que se manifiesta desde el período neonatal. Existen muy pocos casos reportados y se los ha clasificado como ALPS tipo 0 (Le Deist 1996).

La mayoría de los pacientes pertenecen al grupo Ia (>60%), y presentan mutaciones en heterocigosis en el gen *TNFRSF6*. Estas mutaciones generalmente se distribuyen en el dominio muerte de Fas (Sneller 1997, ALPSbase: Database of mutations causing human ALPS) y ejercen un efecto dominante negativo sobre el otro alelo. Este efecto es compatible con el modelo funcional trimérico de Fas (Fisher 1995), en el cual se postula que se necesita la asociación de tres dominios muerte intracelulares de Fas para que pueda producirse toda la cascada de señalización de la apoptosis. Suponiendo que existen cantidades similares de mRNA de Fas normal y defectuoso, la combinación aleatoria en trímeros supone que solo uno de cada ocho complejos sería funcional, explicando por que las mutaciones en heterocigosis producen la enfermedad mediante el efecto negativo que ejercen sobre el alelo normal. Sin embargo se han descrito mutaciones en heterocigosis en otras zonas de la proteína (principalmente extracelulares), cuyo mecanismo estaría mediado por un efecto de haploinsuficiencia (Roesler 2005).

La correlación entre el genotipo de Fas y las manifestaciones clínicas es compleja. La mayoría de estas mutaciones heterocigotas tienen una penetrancia variable. Los familiares directos de los pacientes con ALPS portadores de la mutación pueden tener todos los síntomas de la enfermedad, presentar manifestaciones leves, o incluso pueden ser totalmente asintomáticos (Infante 1998, Jackson 1999), aunque la mayoría presenta un número elevado de linfocitos T DN.

Solamente se han reportado 3 casos pertenecientes al grupo Ib, dos debido a mutaciones en heterocigosis en el gen que codifica para el ligando de Fas (Wu 1996, Bi 2007), y uno debido a una mutación en homocigosis en el mismo gen (Del-Rey 2006).

En algunos pacientes con clínica de ALPS pero que tienen conservada la prueba de apoptosis *in vitro* dependiente de Fas, solo se detectan mutaciones en Fas en linfocitos T DN (y a veces en una fracción de linfocitos T CD4+, de linfocitos T CD8+, de monocitos, y de precursores hematopoyéticos CD34+), indicando que la mutación tiene un origen somático en un clon de células progenitoras que supone una ventaja selectiva frente a las células normales (Holzelova 2004). A esta forma de ALPS (anteriormente incluida en el tipo III) se la denomina ALPS tipo Im para remarcar que se trata de un mosaicismo, y hasta el momento solo se han descrito 10 pacientes.

Los pacientes con ALPS que tienen mutaciones en los genes de caspasa-8 y caspasa-10, se agrupan en el ALPS tipo II. Solo se ha descrito una familia con afectación de caspasa-8. Los individuos homocigotos para la mutación presentan, además de los síntomas de ALPS, un cuadro de inmunodeficiencia debido a una activación defectuosa de los linfocitos T, linfocitos B, y células NKs (Chun 2002). Se han detectado tres mutaciones de caspasa-10 en cuatro familias distintas (Wang 1999, Zhu 2006). Se trata de dos mutaciones puntuales que tienen efecto dominante negativo (L285F y I406L) debido a que se localizan en zonas muy conservadas que afectan la actividad enzimática, y otra mutación que se manifiesta en homocigosis (V410I). Las mutaciones en caspasa-10 no solamente producen una alteración de los linfocitos T, sino que también se altera la homeostasis de las células dendríticas, que se acumulan junto con linfocitos T en las zonas paracorticales de los nódulos linfoides (Wang 1999). La caspasa-10 es común a las vías de apoptosis Fas/FasL y DR4-5/TRAIL, pero normalmente las células dendríticas son más sensibles a la apoptosis mediada por TRAIL que a la vía Fas/FasL, lo cual explica por que los defectos de Fas o FasL no afectan a las células dendríticas.

INTRODUCCIÓN

Un porcentaje variable de los pacientes con ALPS (aproximadamente un 20%) cumplen todos los criterios diagnósticos de la enfermedad pero no se encuentra ninguna mutación en los genes conocidos de la vía de la apoptosis. En general, estos pacientes tienen solo un aumento moderado de linfocitos T DN y la prueba de apoptosis *in vitro* dependiente de Fas suele estar muy poco afectada. Estos casos se agrupan en el ALPS tipo III.

Recientemente se ha descrito un caso debido a alteraciones de la vía intrínseca en un paciente con clínica de ALPS que tiene conservada la prueba de apoptosis *in vitro* dependiente de Fas, pero que presenta una alteración en la apoptosis dependiente de la disminución de IL-2 (Oliveira 2007). Se encontró una mutación puntual en heterocigosis en el gen *NRAS* que produce un aumento de la señalización RAF/MEK/ERK y como consecuencia una disminución de la proteína pro-apoptótica BIM.

7.2.2.4 Aspectos funcionales

Los linfocitos T citotóxicos y las células NKs eliminan a las células diana mediante 2 mecanismos, uno mediado por la secreción de gránulos citotóxicos, y otro a través de la señalización de los receptores inductores de muerte (Fas, TNF). El segundo mecanismo parece tener un rol secundario en la respuesta citotóxica, mientras que su principal función podría ser la de colaborar en la homeostasis del sistema inmune. La mayoría de los linfocitos pasan por un ciclo que comienza con la activación en respuesta a un estímulo antigénico, continúa con la proliferación y la respuesta efectora, y culmina con la muerte celular programada o apoptosis. La apoptosis minimiza las reacciones potenciales contra antígenos propios al limitar la acumulación de los linfocitos activados (Dianzani 2003). La muerte programada de los linfocitos ocurre principalmente mediante dos mecanismos: apoptosis activa y apoptosis pasiva (Lenardo 1999). La apoptosis activa involucra la inducción de la expresión de receptores “inductores de muerte” (principalmente Fas) y sus ligandos (ligando de Fas) en la superficie de los linfocitos T activados. Mediante este mecanismo se produce un control tanto de los propios linfocitos T como de los linfocitos B y las APCs (que expresan Fas en su membrana). La apoptosis pasiva obedece a la disminución de IL-2 que sigue a la eliminación del antígeno y que dispara los mecanismos mitocondriales (Bosque 2007). En este sentido, recientemente se ha reportado un caso de ALPS debido a un defecto en la vía intrínseca (Oliveira 2007). Los

pocos linfocitos que sobreviven a estos dos procesos pasan a constituir el reservorio de memoria.

Es lógico asumir que las manifestaciones autoinmunes en los pacientes con ALPS obedecen a los defectos en la apoptosis. Por una parte se produciría la acumulación de linfocitos (T y B) activados con el consiguiente aumento del riesgo de reacciones cruzadas con antígenos propios y, por otra parte, también estaría afectada la selección negativa en los órganos linfoides primarios (Dianzani 2003). Los pacientes muestran una acumulación de linfocitos T $\alpha\beta$ DN maduros, con fenotipo CD45RA+ y CD57+, y en su mayoría HLA-DR+, que parecen originarse de una población de linfocitos T periféricos CD8+ (y tal vez de algunos linfocitos T CD4+) senescentes que pierden el correceptor. Su rol patogénico es dudoso, puesto que dichos linfocitos T DN no responden a estímulos mitogénicos *in vitro*. Sin embargo, la descripción de pacientes con ALPS portadores de mutaciones somáticas en los linfocitos T DN (Holzelova 2004) sugiere que podrían tener algún papel activo en el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, se ha demostrado que dichos linfocitos son capaces de secretar altas cantidades de IL-10 (Lopatin 2001), lo cual podría favorecer la hipergamaglobulinemia y la producción de autoanticuerpos.

7.2.2.5 Tratamiento

Los síntomas de autoinmunidad tienden a disminuir con la edad, aunque pueden recidivar de forma impredecible en cualquier momento. En casi la mitad de los pacientes con ALPS se realiza una esplenectomía, para controlar la hemólisis y la trombocitopenia que suele estar asociada al hiperesplenismo. Los pacientes que aún después de la esplenectomía sufren episodios de anemia hemolítica autoinmune (AIHA), trombocitopenia y neutropenia, generalmente reciben terapia inmunosupresora (Primary Immunodeficiency Diseases. 2nd Edition).

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Los modelos murinos de supresión génica (knock outs) han sido de gran utilidad para dilucidar la función de distintos componentes del sistema inmune. Sin embargo, no dejan de ser “modelos”, y muchas veces no existe una homología sencilla entre humanos y ratones. En particular, los modelos murinos CD8^{-/-} parecen indicar que el correceptor juega un papel imprescindible en el desarrollo y la función de los linfocitos T del linaje citotóxico. Por lo tanto, la Deficiencia Familiar de CD8 constituye un modelo único para estudiar la función del correceptor CD8 en humanos. Los estudios preliminares en el paciente original con este déficit permitieron identificar un elevado número de linfocitos T $\alpha\beta$ CD4-CD8⁻ que podría corresponderse con linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, debido a la bajísima prevalencia de la enfermedad no ha sido posible, hasta el momento, estudiar con mayor profundidad la respuesta inmune en estos pacientes. Un punto especialmente importante es determinar si en ausencia de CD8 los timocitos restringidos para HLA-I (o algunos de ellos) son capaces de superar el proceso de selección positiva, y si una vez diferenciados a linfocitos T del linaje citotóxico conservan su función efectora. Otra cuestión a determinar es el mecanismo por el cual la mutación puntual de la glicina 111 por serina en la molécula CD8 α conduce a la ausencia total de CD8 en los pacientes. La hipótesis más probable es que la mutación altere la estructura del dominio inmunoglobulina y que como consecuencia se produzca una alteración de la biogénesis de la glicoproteína que dificulte su exportación hacia la membrana celular.

Junto a la Deficiencia Familiar de CD8, se han descrito otras inmunodeficiencias que afectan al eje citotóxico de la respuesta inmune. La Deficiencia de HLA-I, al igual que la de CD8, afecta la etapa de reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T CD8⁺, y también tiene una prevalencia muy baja. El estudio paralelo de pacientes con

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Deficiencia de HLA-I y pacientes con Deficiencia de CD8 puede ser de utilidad para identificar que relación existe entre la alteración en la etapa de reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T CD8+ y las manifestaciones clínicas que presentan ambos grupos de pacientes.

Por último, para tener una visión global de la respuesta inmune antiviral y antitumoral, es necesario estudiar otras inmunodeficiencias que afectan la fase eferente de la respuesta citotóxica, como aquellas que afectan al mecanismo de liberación de gránulos citotóxicos y al mecanismo de apoptosis mediado por Fas.

En resumen, los **objetivos específicos** del trabajo son:

1. Analizar la respuesta inmune en pacientes con Deficiencia Familiar de CD8:
 - Analizar el fenotipo de los linfocitos CD3+CD4-CD8- (T DN),
 - Estudiar el número de linfocitos T DN recién emigrados del timo,
 - Evaluar la respuesta citotóxica,
 - Investigar la posible existencia de linfocitos T DN restringidos para HLA-I y específicos de virus.
2. Estudiar la prevalencia de la mutación Gly111>Ser en la población gitana española y en la población general.
3. Analizar el impacto que ejerce el cambio puntual Gly111>Ser en la molécula mutante CD8 α^{Ser} mediante la siguiente estrategia:
 - Desarrollar moléculas quiméricas de las variantes CD8 α^{Gly} y CD8 α^{Ser} unidas a péptidos marcadores para determinar si la molécula mutante CD8 α^{Ser} es capaz de expresarse en la superficie celular.
 - Realizar estudios bioquímicos de la proteína mutante CD8 α^{Ser} para detectar posibles alteraciones en su biogénesis.
 - Estudiar la capacidad de CD8 α^{Ser} para formar homodímeros y heterodímeros con CD8 β .
 - Estudiar el impacto que tiene el cambio Gly>Ser en CD7, la molécula humana con mayor homología a CD8 α , pero que se expresa como monómero.

4. Analizar un caso de deficiencia de HLA-I como ejemplo de otra inmunodeficiencia primaria que afecta a la etapa de presentación del péptido a los linfocitos T CD8.
5. Analizar otras inmunodeficiencias que afectan a los mecanismos efectores de los linfocitos citotóxicos:
 - Síndrome de Griscelli y Síndrome de Chediak-Higashi (mecanismo de secreción de gránulos citotóxicos).
 - Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (mecanismo de apoptosis mediado por Fas).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras biológicas

1.1 Muestras de Pacientes

Las muestras de pacientes provienen del Hospital Sant Pau de Barcelona, del Hospital Sant Joan de Deu de Esplugues del Llobregat, y del Hospital 12 de Octubre de Madrid. Para realizar los estudios funcionales se partió de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), purificadas a partir de sangre heparinizada por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Para realizar los estudios de fenotipo linfocitario por citometría de flujo se partió de sangre anticoagulada con EDTA o de PBMCs purificadas. Las muestras de individuos control corresponden a donantes sanos. Las muestras de DNA de gitanos fueron cedidas por el Servicio de Inmunología del Hospital Puerta de Hierro de Madrid, y pertenecen a gitanos de la Comunidad de Madrid.

En todos los casos los pacientes y familiares fueron informados y se obtuvo su consentimiento para participar en el estudio.

1.2 Líneas celulares

Las líneas celulares COS-7 (fibroblastos de riñón de mono), Jurkat (leucemia T humana), K562 (eritroleucemia humana), y R69-LCL (línea celular linfoide humana, (HLA-A3, 24; B*2705,7; DR3, 5) se cultivaron a 37 °C y 5% CO₂ en medio RPMI 1640 (*Bio Whittaker*) suplementado con 10% de FCS (*Bio Whittaker*), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de streptomycin (Gibco), y glutamina a una concentración de 2 mM

MATERIALES Y MÉTODOS

(Gibco). Las líneas celulares murinas 300.19 (pre-B), 9.4CwBw (hibridoma T) y L1210.3 (linfoma H-2^d) se cultivaron en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% FCS, 2 mM de glutamina, (1X) aminoácidos esenciales (PAA), (1X) aminoácidos no esenciales (PAA), 1 mM piruvato sódico (Gibco) y 50 μ M β -mercaptoetanol (Sigma).

2. Técnicas de biología molecular

2.1 Extracción de DNA genómico

Se siguió el protocolo de QIAGEN, que permite obtener DNA genómico de alta pureza. Consiste en añadir 200 μ L de PBS a un pellet de leucocitos, 20 μ L de *proteinasa K*, y 200 μ L de *buffer AL*, agitar con vortex, e incubar a 56 °C durante 10 minutos. A continuación se añaden 200 μ L de etanol (96-100%), se agita con vortex, y se aplica la mezcla al interior de la columna *QIAspin*. Se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto y se descarta el filtrado. Luego se realizan dos pasos de lavado, primero con 500 μ L de *buffer AW1* y luego con 500 μ L de *buffer AW2*, esta vez centrifugando a 14000 rpm durante 3 minutos. Por último se eluye el DNA de la columna incubando uno o dos minutos en 200 μ L de *buffer AE* y centrifugando a 8000 rpm durante 1 minuto. La concentración de DNA y el ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ se midió en el espectrofotómetro *GeneQuant pro* (Amersham Bioscience).

2.2 Extracción de RNA

Se realizó por el método *Nucleo Spin RNA II* (Macherey-Nagel). El protocolo consiste en lisar el pellet celular (3-5.10⁶ células) con 350 μ L de *buffer RA1* y 3.5 μ L de β -mercaptoetanol. Se realiza un preclarado del lisado filtrando a través de las columnas *NucleoSpin Filter* y centrifugando 1 minuto a 11000 g. Se agrega al filtrado 350 μ L de etanol al 70%, se agita con vortex y se traspa el contenido a una columna *NucleoSpin RNA II*. Se centrifuga 30 segundos a 8000 g y se agrega 350 μ L de MDB (*membrane desalting buffer*). Se centrifuga 1 minuto a 11000 g. Para eliminar el DNA contaminante se prepara la mezcla de reacción con DNasa en un tubo estéril agregando por cada muestra 10 μ L de *DNasa I* reconstituida a 90 μ L de *DNasa reaction buffer*. Se aplica 95 μ L de la mezcla al centro de la membrana de la columna y se incubaba a temperatura ambiente durante 15 minutos. La Dnasa se inactiva agregando

200 μL de *buffer RA2* a la columna. Se centrifuga 30 segundos a 8000 g y se añaden 600 μL de *buffer RA3* a la columna. Se repite la centrifugación y se realiza otro lavado con 250 μL de *buffer RA3*. Se centrifuga 2 minutos a 11000 g. La elución del RNA se realiza con 60 μL de H_2O en un tubo eppendorf libre de RNasas mediante centrifugación a 11000 g durante 1 minuto.

2.3 Síntesis de cDNA

Se utilizó el sistema *SuperScriptTM III First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen), mediante el cual se amplifica una primera hebra de cDNA a partir de RNA total. En todos los casos se utilizó un *primer reverse* específico del gen. El protocolo consiste en mezclar 200-1000 ng de RNA, 1 μL de *primer reverse* 5 μM , 1 μL de *dNTP mix* 10 mM, y H_2O *Rnasa free* hasta 10 μL . Se incuba 5 minutos a 60 $^\circ\text{C}$ y un minuto en hielo, y paralelamente se realiza la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA que incluye, por cada reacción, 2 μL de *RT buffer* 10X, 4 μL MgCl_2 25 mM, 2 μL DTT 0.1 M, 1 μL *RnasaOUTTM* y 1 μL *SuperScriptTM III RT*. Se añaden 10 μL de la mezcla a cada tubo de RNA/primer/dNTP y se coloca en el termociclador con el siguiente programa: 50 $^\circ\text{C}$ 50 minutos, 85 $^\circ\text{C}$ 5 minutos. Se agrega 1 μL de *Rnasa H* a cada tubo y se incuba 20 minutos a 37 $^\circ\text{C}$.

2.4 Amplificación de DNA genómico o cDNA por PCR

Se utilizaron distintas enzimas (*Taq polimerasa* de Biotools, *CERTAMP for long amplifications* de Biotools o *High Fidelity*, Amersham) según las características de la amplificación. De entrada, se utilizó una temperatura de hibridación 5, 6 y 7 $^\circ\text{C}$ inferior a la temperatura de fusión del *primer* indicada por el fabricante (*Roche*), y después se ajustó al mejor rendimiento obtenido experimentalmente. El tiempo de elongación utilizado fue de 1 minuto/Kb. La mezcla de reacción general, para un volumen final de 25 μL , fue:

MATERIALES Y MÉTODOS

Buffer 10X	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2.5 µL
Mezcla dNTP 10X	2.5 µL
Primer Fw 5 µM	2.5 µL
Primer Re 5 µL	2.5 µL
Polimerasa	1 unidad
DNA (50-100 ng/ µL)	2 µL
H ₂ O	hasta 25 µL

Para la visualización del producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR diluido a la mitad en tampón de muestra Blue Juice 2X (H₂O, glicerol, azul de bromofenol). Para determinar el tamaño del fragmento del amplicón, se cargó el gel paralelamente con un marcador de peso molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder, Gibco*). Se utilizaron los siguientes *primers*:

Nombre	Secuencia
Primers CD8	
Región codificante de CD8	
CD8α MET	5'-GTCATGGCCTTACCAGTGAC-3'
CD8α RE	5'-CGCCCCACTAAAATAAT-3'
Amplificación de exones 1 y 2 de CD8	
CD8α MET	5'- GTCATGGCCTTACCAGTGAC-3'
CD8α INTRÓN2	5'-GTTGAGGTGAACCCCAAGCC-3'
Generación de las construcciones UCHL/CD8	
UCHL/CD8-F	5'-AGCCCGG <u>GTCGAC</u> CGAGCCAGTTCCGGGTGTCG-3'
BGH-RE	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
Generación de las construcciones CD8/V5	
CD8V5-F	5'- CACC ATGGCCTTACCAGTGACCGCCT-3'
CD8V5-R	5'-GACGTATCTCGCCGAAAGGCTGG-3'
Mutagénesis dirigida CD8 ^{Gly→Ser}	
CD8V5-Mut-F	5' CGCCGAGAGAACGAGAGCTACTATTTCTGC 3'
CD8V5-Mut-R	5' GCAGAAATAGTAGCTCTCGTTCTCTCGGCG 3'
Mutagénesis dirigida CD8 ^{Asn→Asp}	
CD8wt-D-F	5'-CGCCGAGAGGACGAGGGCTACTATTTCTGC-3'
CD8wt-D-R	5'-GCAGAAATAGTAGCCCTCGTCCTCTCGGCG-3'
CD8-S-D-F	5'-CGCCGAGAGGACGAGAGCTACTATTTCTGC-3'
CD8-S-D-R	5'-GCAGAAATAGTAGCTCTCGTCCTCTCGGCG-3'
Región codificante de CD8β	
CD8β-F	5' CAGCTGACAGTTCTCCATGG 3'
CD8β-R	5' CGGCACACTCTTCTTGAG 3'
Primers Lyt-2	

Nombre	Secuencia
Generación de las construcciones UCHL/Lyt-2	
Lyt2/UCHL1	5'-AGCCCGGGTCGACAGGCACCCGAACCTCCGAATC-3'
Mutagénesis dirigida Lyt-2 ^{Gly→Ser}	
Lyt2-S-F	5'- GCAAGGAAAACGAAAGCTACTATTTCTGC -3'
Lyt2-S-R	5'- GCAGAAATAGTAGCTTTCGTTTTTCCTTGC -3'
Primers CD7	
Región codificante de CD7	
CD7-cDNA-F	5'-GCTCTCTGTGGGGTCCTGTA-3'
CD7-cDNA-R	5'-TGTGTGTCTGCTTGGAGCTG-3'
Mutagénesis dirigida CD7 ^{Gly→Ser}	
CD7-MUT-F	5'-CAGCTGTCGGACACTAGCACCTACACCTGC-3'
CD7-MUT-R	5'-GCAGGTGTAGGTGCTAGTGTCCGACAGCTG-3'
Primers TAP	
Región codificante de TAP1	
TAP1cDNA-F1	5'-GTGCCAATGGCTAGCTCT-3'
TAP1cDNA-R1	5'-CCTGTCTGGTCTGTTGGAA-3'
TAP1cDNA-F2	5'-TGTCCTGCGCCAGGAGACGG-3'
TAP1cDNA-R2	5'-AGTGCGCAGGTCTGAGAAGG-3'
Primers genómicos TAP2	
TAP2ex1y2-F	5'-GTAGGAGGGCAGGGACAAG-3'
TAP2ex1y2-R	5'-GGCCTAGAAATGGAGTTAGGG-3'
TAP2ex3y4-F	5'-GCTTGCTCCTCTGTTTCACC-3'
TAP2ex3y4-R	5'-AGGGGATCCTCTAGCCACAA-3'
TAP2ex5y6-F	5'-AGCATCTCACTGGCTGGAGT-3'
TAP2ex5y6-R	5'-TGCGGGTTTTGGTTTTGTAT-3'
TAP2ex789F	5'-GGAACAGTGGGGTATTGGTG-3'
TAP2ex789-R	5'-GCATTGCTCTCTGCAAACAA-3'
TAP2x1011-F	5'-TACCTGCTGTGCACTTGCC-3'
TAP2x1011-R	5'-CACCTCTTACCCCAACAAA-3'
Primers RAB27A	
Región codificante de RAB27	
RAB27cDNA-F	5'-CAAGCGTTCTCTACCCTGT-3'
RAB27cDNA-R	5'-CATGGGCCACCTGAACTACT-3'
Primers genómicos RAB27	
RAB27ex2-F	5'-ATACAACCCGTAGACATACAGGTTAACA-3'
RAB27int2-R	5'-AAACATATAACAAAAAGGGAA-3'
RAB27ex3-F	5'-GATGGCATTCTCTTGGAAATTTAGATGC-3'
RAB27ex3-R	5'-AATTTGGCAGCATTCAAGTGCAAACCAACG-3'
RAB27ex4-F	5'-TAAACTGATATAAGTGATAAATAACTATCC-3'
RAB27ex4-R	5'-TAAAATAGTATTTGCACTAAGATCTCCTCC-3'
RAB27int4-F	5'-AAATAACTTCATCAGGGTCACA-3'

Nombre	Secuencia
RAB27int2F	5'-CACCATTTTGGTTTATCCATTTGTCT
RAB27ex5-R	5'-GCTGAGGTTTTGCTTTAATTGT-3'
RAB27del-F	5'-TTAGTGGACAGCTAATGAGTGG-3'
RAB27del-R	5'-TGTTCTGTCTCCTCATCTGAGT-3'
Primers de genes relacionados con la apoptosis	
Región codificante de FAS (TNFRSF6)	
FAScDNA-F	5'-GGGAAGCGGTTTACGAGTGA-3'
FAScDNA-R	5'-TGGGGTTAGCCTGTGGATAGAC-3'
Primers genómicos FAS	
FASex2-F	5'-CAATTTTGGGTGGGTACACTTG-3'
FASex2-R	5'-TTCTCATTTTCAGAGGTGCATGTCA-3'
FASex9-F	5'-AAATAAACATGGTTTTCACTAATGGG-3'
FASex9-R	5'-ACA AAT ATG TTG GCT CTT CAG CGC-3'
Región codificante de FASL	
FASL-F	5'-TGACTCACCAGCTGCCATGCAG-3'
FASL-R	5'-GGAAAGAATCCCAAAGTGCTTCTC-3'
Promotor de Caspasa-8	
P-Casp-8-F	5'-CTGCATGCCAGGAGCTAAGT-3'
P-Casp-8-F	5'-GCCATAGTAATTCTTGCTCTGC-3'
Región codificante de Caspasa-10	
Caspasa-10-F	5'-GAGAACCGTTTACTTCCAGAAGATTG-3'
Caspasa-10-R	5'-GCTGGAGTTATAGCCAATGATTCG-3'
Exón 9 de Caspasa-10	
Casp10ex9-F	5'-CGGCCTTGTTTCAGTT-3'
Casp10ex9-F	5'-CACCTTACCAAAGGTGTTGA-3'

Tabla III.1: *Primers* utilizados para realizar las distintas construcciones o para el análisis genético de las inmunodeficiencias. Las secuencias subrayadas representan la diana de restricción Sall. Los nucleótidos que introducen una mutación o una estrategia de clonaje se indican en negrita.

2.5 Secuenciación de un producto de PCR o de un plásmido

Antes de secuenciar los productos de PCR se realizó un paso de purificación mediante el método *EXOSAP-IT* (Amersham) o mediante precipitación con etanol. Consiste en agregar 2 μ L de *EXOSAP-IT* por cada 5 μ L de PCR e incubar la mezcla a 37 °C 15 minutos, y a continuación a 80 °C 15 minutos para inactivar los enzimas.

Para realizar la reacción de secuencia se empleó el kit de secuenciación *BigDye terminator v1.1* (AppliedBiosystems), según la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 10 μ L:

<i>BigDye terminator v1.1</i>	2 μ L
<i>BigDye secuencing buffer 5X</i>	2 μ L
Primer de secuencia 5 μ M	0.5 μ L
Producto PCR purificado	2.5 μ L
H ₂ O	3 μ L

El programa de amplificación realiza un ciclo de 1 minuto a 96 °C y 25 ciclos de 10 segundos a 96 °C, 10 segundos a 50 °C, y 2 minutos a 60 °C.

El producto de la reacción de secuencia se purificó mediante columnas de exclusión molecular (Amersham). El análisis se realizó con el secuenciador automático *ABI PRISM 3100*. La interpretación se realizó con el *software ABI PRISM*.

2.6 Clonaje de un producto de PCR

Los vectores pCR2.1-TOPO (Figura III.1 A) y pcDNA3.1 (Figura III.1 B) (*Invitrogen*), contienen una secuencia poli-T en sus extremos 3'. El inserto proviene de una amplificación con Taq polimerasas que añaden una cola poli-A al extremo 3' del producto de PCR, de forma que la reacción de ligación se produce por apareamiento A-T y el inserto se une con igual probabilidad en las dos orientaciones. La reacción de ligación se realizó mezclando el vector y el producto de PCR (diluido en más o menos agua según la intensidad del fragmento de amplificación) y solución salina (ya que se utilizaron bacterias químicamente competentes). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

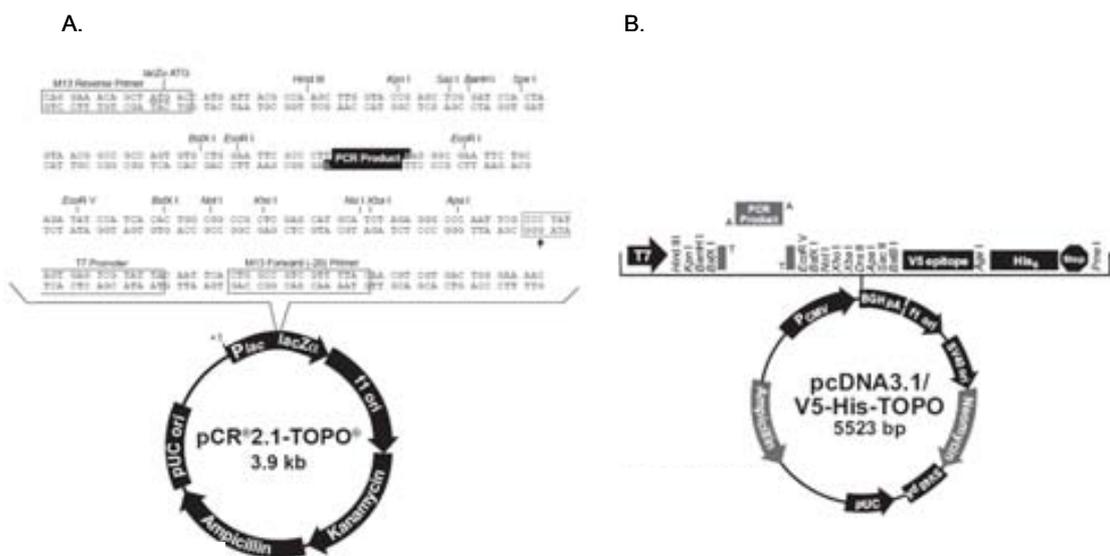


Figura III.1: Vectores utilizados para clonar un producto de PCR.

2.6.1 Transformación

Se agregaron 2 μL de la reacción de ligación a 30 μL de bacterias (*E. Coli DH5 α* , Invitrogen). Se incubó durante 30 minutos en hielo y se realizó el choque térmico a 42.5 $^{\circ}\text{C}$ durante 35 segundos. Se colocaron las bacterias en hielo durante 5 minutos, se agregaron 200 μL de medio SOC, y se incubó durante 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ en agitación. Se sembraron 100 μL sobre una placa atemperada de LB-agar con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó O/N a 37 $^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, se picaron las colonias en 2mL de medio LB con ampicilina y se incubó O/N a 37 $^{\circ}\text{C}$ en agitación. Este cultivo se utilizó para la extracción del plásmido.

2.7 Subclonaje

Se realiza esta técnica cuando se desea pasar el inserto de un plásmido “dador” a otro “aceptor”, más adecuado para el tipo de ensayo que quiera realizarse. Se realizaron digestiones de ambos plásmidos con las endonucleasas de restricción correspondientes según la estrategia de subclonaje. A continuación se separó el inserto (liberado tras la digestión) del plásmido “dador” mediante electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, para facilitar su posterior purificación (ver apartado 2.8). Una vez purificado el inserto, se estimó la concentración del mismo y del plásmido aceptor y se realizó la **ligación** con el sistema *DNA Ligation Kit Ver. 2.1* (TaKaRa). Se realizó una mezcla del inserto y el plásmido en una relación molar 3:1 (en un volumen final de 10 μL) utilizando aproximadamente 100 ng de vector y la cantidad de inserto correspondiente que se calcula como: $\text{ng inserto} = \text{ng vector} * (\text{Kb inserto}/\text{Kb vector})$. A continuación se agregó el mismo volumen de la solución I del kit (en este caso 10 μL) que contiene el enzima T4 DNA ligasa en un sistema *buffer* optimizado. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 16 $^{\circ}\text{C}$ y a continuación se procedió directamente a la transformación bacteriana (ver apartado 2.6.1).

2.8 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Se utilizó el protocolo *GENECLEAN[®] Turbo* (Bio101[®] SYSTEMS), que consiste en recortar la banda de DNA de interés con la menor cantidad de gel posible y colocarla en un tubo *ependorf* de 1,5 mL. Se agregan 100 μL de *GENECLEAN[®] Turbo Salt Solution* por cada 0,1 g de gel, se mezcla por inversión hasta que la solución quede

homogénea y se incuba a 55 °C durante 5 minutos para fundir el gel. A continuación se transfiere el contenido a la columna *GENECLEAN® Turbo Cartridge* y se centrifuga 5 segundos a 14000 g. Luego se lava la columna con 500 µL de *GENECLEAN® Turbo Wash Solution*. Después de centrifugar 5 segundos a 14000 g y vaciar el colector, se vuelve a centrifugar 4 minutos para eliminar todos los restos de solución de lavado de la columna. La columna se traspara a un tubo *ependorf* y se agrega en el centro de la membrana 30 µL de *GENECLEAN® Turbo Elution Solution*. Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga un minuto a 14000 g para recuperar el eluido que contiene el DNA.

2.9 Extracción del plásmido

2.9.1 *Pequeña escala: Miniprep por lisis alcalina*

Se inocula una colonia en 2 mL de medio de cultivo LB suplementado con antibiótico (ampicilina 100 µg/mL) y se incuba O/N a 37 °C en agitación. Se traspara el cultivo a un *ependorf* de 2 mL y se coloca 10 minutos en hielo. Se centrifuga a máxima velocidad a 4 °C y se descarta el sobrenadante. Se disuelve el pellet en 100 µL de la solución 1 de lisis (glucosa 50mM, EDTA pH 8 10mM, Tris pH 8 25 mM) y se pipetea hasta obtener una mezcla homogénea. Se agrega 200 µL de la solución 2 de lisis fresca (NaOH 0.2N, SDS 1%), se mezcla el tubo por inversión y se coloca 5 minutos en hielo. Se añade 150 µL de la solución 3 (acetato de potasio 3M, acético glacial 5M), se agita con vortex el tubo invertido durante 10 segundos, y se incuba en hielo 5 minutos. Se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad y se traspara el sobrenadante a un tubo limpio evitando arrastrar el pellet que contiene el DNA bacteriano. Se agrega 450 µL de fenol/cloroformo (vol:vol), se agita con vortex y se centrifuga 2 minutos a máxima velocidad a temperatura ambiente. La fase acuosa que contiene el DNA plasmídico se traspara a un tubo nuevo y se agrega 900 µL de etanol 100%. Se agita con vortex y se incuba 2 minutos a temperatura ambiente. La precipitación del DNA plasmídico se consigue mediante 15 minutos de centrifugación en frío a máxima velocidad. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet. Para eliminar el RNA contaminante, se resuspende el pellet en 50-100 µL de *buffer* TE + RNasa (10 µg/mL).

2.9.2 Gran escala: Maxiprep

Este método permite obtener grandes cantidades de plásmido de alta pureza. Se utilizó el protocolo *QIAfilter Plasmid Purification* (QIAGEN). Se inocula una colonia aislada en 2 mL de medio LB/Ampicilina y se incuba a 37 °C en agitación 6-8 hs. Se traspasa 100 µL del cultivo a un erlenmeyer con 100 mL de LB/Ampicilina (100 µg/mL) y se incuba a 37 °C en agitación 12-16 hs. Se obtiene el pellet bacteriano mediante centrifugación en frío a 6000 g durante 15 minutos y se resuspende en 10 mL de *buffer* P1 con Rnasa A (lisis alcalina). Se añade 10 mL de *buffer* P2, se mezcla por inversión 4-6 veces y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Se agrega 10 mL de *buffer* P3 frío, se invierte el tubo 4-6 veces y se traspasa el contenido inmediatamente al interior de la jeringa *QIAfilter Cartridge*. Para un mejor aclaramiento del lisado se incuba 10 minutos a temperatura ambiente antes de filtrar el contenido. Paralelamente se equilibra la columna QIAGEN-tip que contiene la resina de unión al DNA agregando 10 mL de *buffer* QBT y dejando que atraviese la columna por gravedad. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se filtra el lisado con ayuda del émbolo al interior de la columna y se deja que baje el contenido por gravedad. Se lava 2 veces la columna con 30 mL de *buffer* QC cada vez. El DNA se eluye con 15 mL de *buffer* QF a un tubo corex de 30mL y se precipita agregando 0.7 volúmenes de isopropanol y centrifugando a 15000 g durante 30 minutos en frío. Se lava el pellet con etanol al 70% y una vez seco se resuspende en el volumen deseado de *buffer* TE.

2.10 Digestión con endonucleasas de restricción

La digestión de plásmidos con enzimas de restricción se utilizó con el fin de averiguar la orientación del inserto, analizar la presencia de las mutaciones introducidas por mutagénesis dirigida (en los casos en los que la mutación crea o destruye una diana de restricción), realizar subclonajes de los insertos deseados a vectores más adecuados, y para linealizar los plásmidos antes de realizar las transfecciones estables. Las construcciones cuyo patrón de digestión coincidía con el deseado, fueron analizadas por secuenciación. También se realizó digestión con enzimas de restricción de productos de PCR, para analizar la presencia de mutaciones y deleciones. La mezcla de reacción para 1 µg de DNA es:

<i>Buffer</i> de reacción 10X	2 μ L
Endonucleasa de restricción	1 unidad
DNA	1 μ g
H ₂ O	hasta 20 μ L

Para la mayoría de los enzimas las condiciones de reacción son 30 minutos a 37 °C.

2.11 Mutagénesis dirigida

Se empleó el sistema *QuikChange^R Site-Directed Mutagenesis* de Stratagene para crear mutaciones puntuales en el inserto de interés dentro de un vector. Se utilizaron *primers* de aproximadamente 30 nucleótidos, complementarios, que cubren la misma región del vector pero en cadenas opuestas, con la mutación de interés en la región central. Los ciclos de extensión se realizaron con la polimerasa *Pfu Turbo^R* (Stratagene) que replica ambas cadenas del plásmido con alta eficiencia y conserva la estructura circular. Se probaron dos relaciones DNA/*primer*, variando la cantidad de plásmido y manteniendo constante la cantidad de *primer*, realizando una reacción con 20 ng de plásmido y otra con 50 ng y con la misma mezcla de reacción: 5 μ L del *buffer* de la polimerasa Pfu, 1,25 μ L *Primer forward* (125ng), 1,25 μ L *Primer reverse* (125ng), 1 μ L dNTPs 16mM, 1 μ L *Pfu Turbo* (2,5 U/ μ L), H₂O hasta 50 μ L. El programa de amplificación contiene 1 ciclo de 95 °C, 30 segundos y 15 ciclos de 95 °C, 30 segundos, seguido de 68 °C (1 minuto/kb). Para digerir el plásmido de origen bacteriano usado como material de partida (que no contiene la mutación), se agregaron 10 U de Dpn I a cada tubo y se incubó 1 hora a 37 °C. La endonucleasa DpnI reconoce específicamente el DNA metilado y hemimetilado de origen bacteriano. Por último se procedió a la transformación bacteriana (ver 2.6.1).

3. Construcciones

3.1 UCHL-CD8^{Gly} y UCHL-CD8^{Ser}

Esta construcción se diseñó para tener un péptido marcador en el extremo extracelular de la proteína (extremo amino) y poder detectar fácilmente, mediante anticuerpos dirigidos contra él, si la glicoproteína CD8 α ^{Ser} se expresa en la membrana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar esta construcción se partió, por un lado, del plásmido pMT2.UCHL-1 que contiene un péptido derivado de la proteína CD45RO, el epítipo UCHL-1 y, por otro lado, de un plásmido donde se ha clonado la región codificante de CD8 α . La región codificante completa de CD8 α^{Gly} (nativa) y CD8 α^{Ser} (mutante) se obtuvo mediante RT-PCR de muestras de RNA de un miembro de la primera familia no portador de la mutación y del paciente homocigoto para la mutación, respectivamente. Se utilizaron los *primers* CD8 α Met y CD8 α -R (Ver Tabla III.1), y los productos de amplificación se clonaron en el vector pcDNA3.1/V5/His. Se diseñó el *primer* UCHL/CD8-F para incluir un sitio de restricción para Sal I al final del *leader* de CD8 α . El plásmido pcDNA3.1/V5/His contiene una diana de Xba I al final de la secuencia de CD8 α . Se amplificó con el primer UCHL/CD8 y con el primer del vector BGH-R la región de CD8 α incluyendo los sitios de restricción para Sal I y Xba I. El producto de amplificación se digirió con una mezcla de estas dos enzimas y se ligó al vector pMT2.UCHL1 que fue previamente digerido con Sal I y Xba I (ver 2.7). Como consecuencia, se obtuvieron las variantes de CD8 (Gly y Ser) unidas al péptido UCHL-1 derivado de CD45RO humano mediante el extremo amino terminal (pMT2.UCHL1/CD8 α).

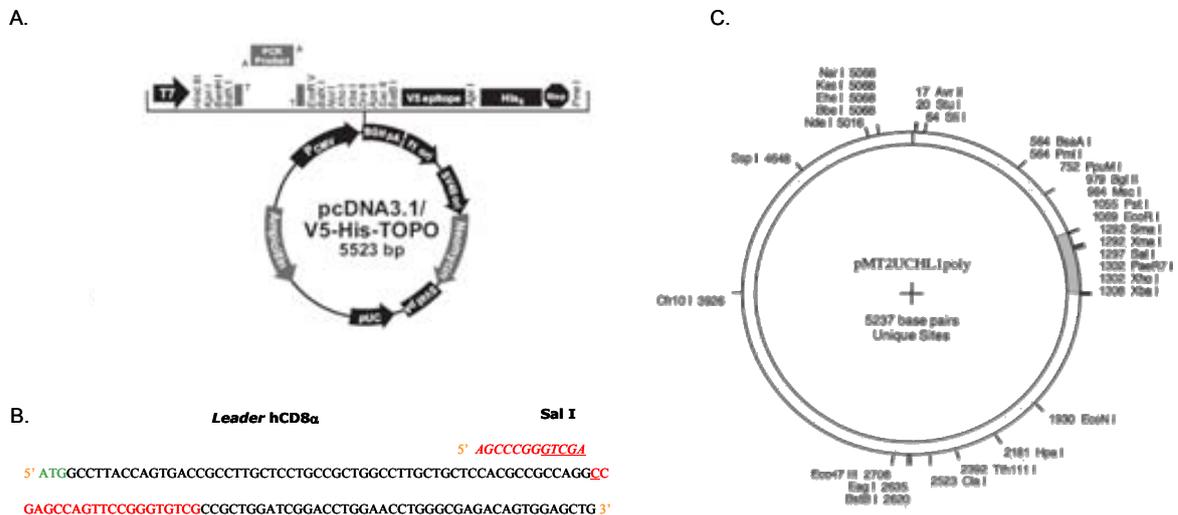


Figura III.2: Esquema de la generación de UCHL/CD8. A. Vector donde se clonó la región codificante de CD8 α^{Gly} y CD8 α^{Ser} . B. Diseño del primer para introducir la diana de restricción de SalI. C. Vector donde se subclonó CD8 α^{Gly} y CD8 α^{Ser} para obtener las construcciones UCHL/CD8.

La construcción UCHL-CD8 se subclonó del vector pMT2.UCHL1 al vector pH β Apr-1-neo, que permite seleccionar con Geneticina las células transfectadas de forma estable con este plásmido.

3.1.1 UCHL1-CD8 N→D

Para eliminar la diana de N-glicosilación que genera la mutación Gly>Ser, se realizó una mutagénesis dirigida Asn(N)→Asp(D) en los plásmidos pMT2.UCHL1/CD8^{Gly} (con los *primers* CD8wt-D-F y CD8wt-D-R) y pMT2.UCHL-1/CD8^{Ser} (con los *primers* CD8-S-D-F y CD8-S-D-R), con el fin de obtener pMT2.UCHL-1/CD8^{GlyD} y pMT2.UCHL1/CD8^{SerD}.

3.2 UCHL1-Lyt-2^{Gly} y UCHL1-Lyt-2^{Ser}

Para obtener las variantes de Lyt-2 unidas al péptido marcador en el extremo amino terminal, se siguió un procedimiento análogo al que se empleó en el caso de las variantes de CD8 humanas. La variante mutante Lyt-2^{G125S} se obtuvo mediante mutagénesis dirigida Gly→Ser en el plásmido pcDNA3.1/Lyt-2^{WT} (*primers* Lyt2-S-F Lyt2-S-R). Para incluir la diana Sal I se diseñó el *primer* UCHL/Lyt-2-F. Se utilizó este *primer* en combinación con BGH-RE para amplificar los plásmidos pcDNA3.1/Lyt-2^{WT} y pcDNA3.1/Lyt-2^{G125S}. A continuación se digirió el producto de amplificación con una mezcla de Sal I y Xba I y se ligó al plásmido pMT2.UCHL1 previamente digerido con los mismos enzimas. La construcción UCHL-Lyt-2 se subclonó al vector de expresión pXSneo para poder realizar las transfecciones estables.

3.3 CD8^{Gly}-V5 y CD8^{Ser}-V5

Se amplificó la región codificante de CD8α con los *primers* CD8-V5-F y CD8-V5-R, utilizando una polimerasa que produce productos de PCR con extremos romos (Pfu). El *primer forward* (Ver tabla III.1) incorpora la secuencia CACC complementaria al extremo 3' protruyente del vector pcDNATM 3.1D/V5-His-TOPO[®] (Invitrogen), y permite clonar el inserto en forma direccional. El *primer reverse* excluye el codón de terminación TAA y permite unir el inserto conservando el marco de lectura de forma que el epítipo V5 queda unido al extremo carboxi-terminal de CD8α. El péptido V5 deriva de las proteínas P y V del virus SV5.

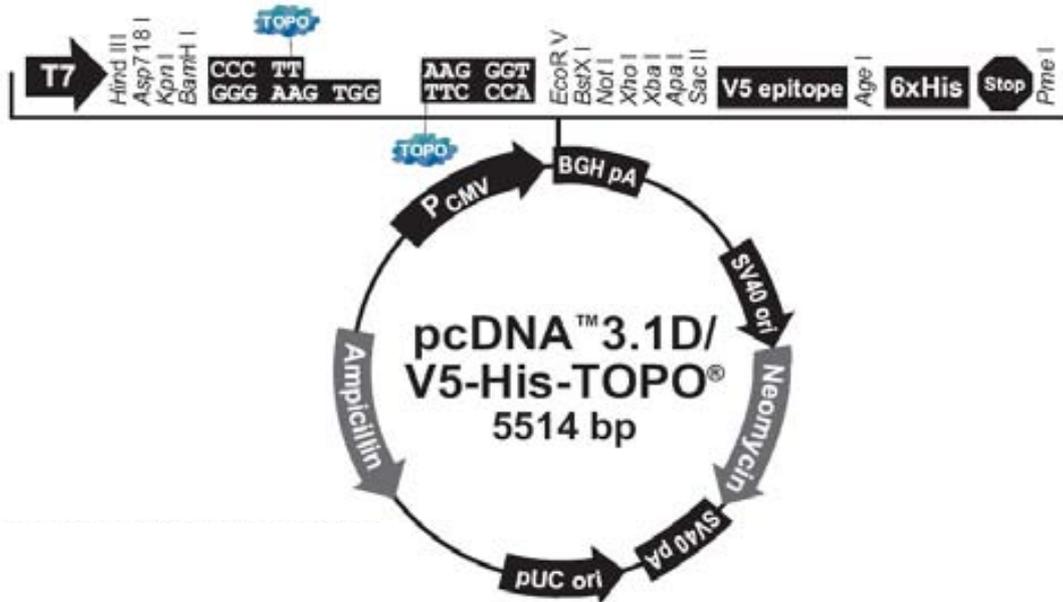


Figura III.3: Esquema del vector utilizado para obtener la construcción pcDNA3.1/CD8^{Gly}V5.

Una vez obtenida la construcción pcDNA3.1/CD8^{Gly}V5, se realizó una mutagénesis dirigida con los *primers* CD8V5-Mut-F y CD8V5-Mut-R para obtener la construcción pcDNA3.1/CD8^{Ser}V5.

3.3.1 CD8/V5 N→D

Para corroborar la presencia de la N-glicosilación mediante estudios bioquímicos, se realizó una mutagénesis dirigida de Asn>Asp en pcDNA3.1D/CD8^{Ser}V5 con el objetivo de eliminar la diana de N-glicosilación en CD8^{Ser} (de la misma forma que en 3.1.1 y utilizando los mismos *primers*). Para tener un control del cambio Asn>Asp, también se realizó dicho cambio en pcDNA3.1D/CD8^{Gly}V5.

3.4 pPXsneo/CD7^{Gly} y pXSneo/CD7^{Ser}

La región codificante completa de CD7 se obtuvo mediante extracción de RNA de la línea JURKAT, retrotranscripción con *primers* específicos de CD7 (CD7cDNA-R) y amplificación del cDNA resultante por PCR (CD7cDNA-F/ CD7cDNA-R). El producto de amplificación se clonó en el vector PCR2.1 (ver 2.6) y luego se subclonó en el vector de expresión pXSneo. El subclonaje se realizó digiriendo ambos vectores con XbaI y SacI y siguiendo los pasos que se indican en 2.7. Debido a que la ubicación relativa de las

dianas de restricción en PCR2.1 es inversa a la de pXSneo, se eligió un plásmido PCR2.1 que contenía el inserto CD7 en orientación 3'→5'.

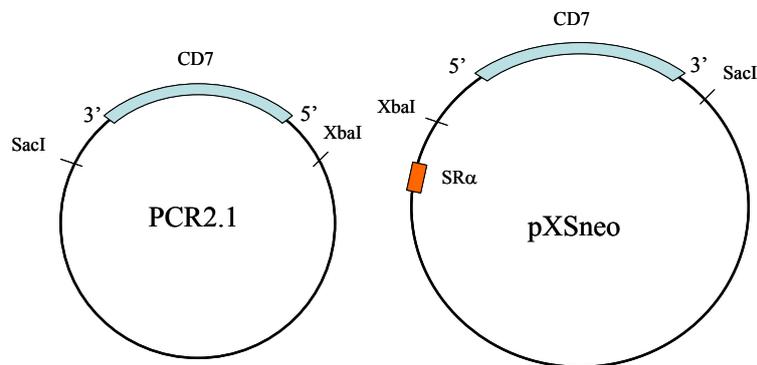


Figura III.4: Esquema de obtención de la construcción pXSneo/CD7^{Gly}.

Una vez subclonado CD7 en la orientación correcta en pXSneo, se procedió a la mutagénesis dirigida Gly>Ser con los primers CD7-MUT-F y CD7-MUT-R para obtener pXSneo/CD7^{Ser}.

3.5 pCDNA3.1/CD7^{Gly} y pCDNA3.1/CD7^{Ser}

Esta construcción se realizó clonando directamente la región codificante de CD7 (ver 2.6) en el vector de expresión pcDNA3.1/V5-His[©] TOPO TA[®]. La variante CD7^{Ser} se obtuvo a partir de esta misma construcción mediante mutagénesis dirigida Gly>Ser igual que en el punto anterior.

3.6 pcDNA3.1/CD8β

Se amplificó la región codificante completa de CD8β humano mediante RT-PCR de muestras de RNA de un individuo control (*primers* CD8β-F y CD8β-R) y se clonó en el vector pcDNA3.1/V5-His[©] TOPO TA[®] (ver 2.6).

4. Técnicas de cultivo celular

4.1 Transfección transitoria en la línea celular COS7

Se ajustaron las células a 60.000 cels/ml en medio RPMI completo (10% FCS), y se distribuyó 1 ml en cada pocillo de una placa de 12 (al día de la transfección alcanzaron un 50-80% de confluencia). A las 24 horas se agregó el DNA plasmídico y el reactivo FuGENE 6 (Roche) en proporción 2:5 (2 μ g DNA plasmídico: 5 μ L FuGENE), y se incubó durante 20 minutos. Previamente se mezcló el FuGENE con medio de cultivo RPMI sin aditivos en la proporción: 100 μ L RPMI: 5 μ L de FuGENE 6. La expresión de la molécula transfectada se determinó aproximadamente a las 48 horas.

4.2 Cotransfección de CD8 α y CD8 β

Se procedió de la misma forma que en el apartado anterior pero en este caso el DNA que se transfectó fue una mezcla de los plásmidos que contienen la cadena α y la cadena β de CD8. Para disminuir la probabilidad de homodimerización $\alpha\alpha$, se utilizó una proporción 1 α :4 β .

4.3 Transfección estable del hibridoma murino 9.4CwBw por electroporación

Se partió de 10-12 μ g de plásmido linearizado resuspendido en 10 μ L de H₂O destilada estéril, y 10⁷ células 9.4BwCw (a 250.000 cels/mL) lavadas 2 veces con PBS frío estéril y resuspendidas en 460 μ L de PBS frío estéril. La suspensión celular se traspasó a la cubeta de electroporación (BioRad) y se agregaron los 10 μ L de la suspensión del plásmido. Antes de proceder a la electroporación, la mezcla se incubó 5 minutos en hielo. Las condiciones de electroporación fueron: 250 V y 960 μ F. Una vez realizado el choque eléctrico se colocó nuevamente la cubeta en hielo 5 minutos y se resuspendió el contenido en 30 mL de DMEM completo con 20% FCS en un frasco de cultivo. Al día siguiente se contaron las células y se resuspendieron en medio DMEM completo con 20% FCS y 1,7 mg/mL de G-418 (Gibco) a una densidad de 40000 cels/mL, y se distribuyó el contenido en placas de 24 pocillos (1 mL/ pocillo). A los 8-10 días, se traspasó parte del contenido de los pocillos en los que se observó crecimiento celular a nuevas placas

de 24 pocillos con medio DMEM con 20% FCS y G-418 a la misma concentración. Se determinaron los niveles de expresión de la molécula de interés por citometría de flujo y el contenido de los pocillos positivos se traspasó a frascos de cultivo de 25 mL. Cuando la expresión no resultó homogénea se procedió a aislar por dilución límite las clonas de mayor expresión.

4.4 Transfección estable de la línea murina 300.19

Se procedió de la misma forma que en el caso de la línea celular 9.4, pero se partió de $5 \cdot 10^6$ células (a 300.000 cels/mL). El contenido de la cubeta se resuspendió en 10 mL de DMEM completo con 20% FCS. Para asegurar la eficiencia de la selección con el antibiótico, se realizaron distintas diluciones de la suspensión celular en medio de cultivo DMEM con 20% FCS: 1/6, 1/12, y 1/18, y con cada una de ellas se montó una placa de 48 pocillos (250 μ L/pocillo). Al día siguiente se agregó a cada pocillo 250 μ L de DMEM con 20% FCS y G418 2X (3,4 mg/ml). En los pocillos en los que se observó crecimiento celular se traspasó parte de su contenido a placas de 24 pocillos con medio DMEM 20% FCS y G418 a 1,7 mg/ml (Gibco).

4.5 Inhibición de la N-glicosilación

Para inhibir la adición de carbohidratos unidos a residuos de asparagina y posteriormente realizar el estudio bioquímico de la proteína mutante CD8 α ^{Ser} se utilizó un antibiótico inhibidor del proceso de N-glicosilación denominado tunicamicina. Se cultivaron las células 300.19 transfectadas con las variantes nativa y mutante de CD8 α -V5 en placas de 6 pozos (10^6 cels/5 mL/pozo) durante 48 horas en DMEM 10% FCS y 20 ng/mL o 40 ng/mL de tunicamicina (Sigma).

4.6 Modificación del procesamiento de N-carbohidratos

Se utilizaron dos inhibidores de enzimas del retículo endoplasmático (RE) que participan en el procesamiento de los N-carbohidratos. Dicho procesamiento es muy importante para que pueda tener lugar el control de calidad de glicoproteínas del RE dependiente de N-carbohidratos. La NB-DNJ es un inhibidor de las glicosidasas I y II, mientras que Kifunensine es un inhibidor de la manosidasa I. Las células 300.19

MATERIALES Y MÉTODOS

transfectadas con UCHL-CD8 se incubaron en presencia de 10 mM de NB-DNJ (Sigma), 1 μ M de kifunensine (Sigma) o 10 μ M de kifunensine durante 48 horas. Para los estudios de expresión por citometría de flujo se realizó el cultivo en placas de 24 pozos (10^5 células/1 mL/ pozo), mientras que para el estudio bioquímico se utilizaron las células cultivadas en placas de 6 pozos (10^6 células/ 5mL/ pozo).

5. Técnicas de citometría de flujo

Todas las muestras se analizaron en el citómetro de flujo Beckman Coulter XL y se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales.

Nombre/Clon	Especificidad/Marca
CD8-FITC (T8)	CD8 α humano (Coulter)
CD8-FITC (MEM-31)	CD8 α humano (Immunotools)
CD8-PE (4H8)	CD8 α humano (Immunotools)
CD8-PE (T8)	CD8 α humano (Coulter)
2ST8.5H7-PE	CD8 β humano (Immunotech)
CD8 β (5F2)	CD8 β humano (Santa Cruz)
CD7-FITC (186-M)	CD7 humano (Immunotools)
CD7 (142-9)	CD7 humano, SN (R.Vilella, Hosp. Clinic, BCN)
CD7 (CBC.37.8)	CD7 humano (T. Al Saati, Inserm U563, Toulouse)
CD8 murino-PE (53-6.7)	CD8 α murino, Lyt-2 (Pharmingen)
CD3-PC5	CD3 humano (Coulter)
CD4-ECD	CD4 humano (Coulter)
CD27-PE	CD27 humano (Immunotech)
CD28-PE	CD28 humano (Immunotech)
UCHL1 -PE	CD45RO humano (Pharmingen)
CD45RA-FITC	CD45RA humano (Immunotools)
HLA-DR-PE	HLA-DR humano (Immunotech)
Perforina-PE	Perforina humana (e-Bioscience)
CD107a-PE	Proteína 1 de la membrana lisosomal (BD)
CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5	CD45, CD4, CD8, CD3 humano (Coulter)
CD45-FITC/CD56-PE/CD19-ECD/CD3-PC5	CD45, CD56, CD19, CD3 humano (Coulter)
GAM-F(ab) ₂ -FITC	IgG murina (Caltag)

5.1 Inmunofluorescencia directa

Sangre total: Se añadieron los anticuerpos monoclonales correspondientes (a la concentración indicada por el fabricante) a 100 μ L de sangre. Se agitó con vortex y se incubó en oscuridad durante 10-15 minutos a temperatura ambiente (15-25 $^{\circ}$ C). A continuación se realizó el lisado de los hematíes y fijación automática de los leucocitos (TQ-prep, Coulter).

Células mononucleares (PBMC) aisladas o líneas celulares: Se lavaron las células (aproximadamente $3 \cdot 10^5$ cls/ensayo) en tampón de lavado (PBS, 3 % FCS, 0,1 % azida sódica). A 50 μ L de la suspensión celular se añadió el anticuerpo monoclonal y 50 μ L de tampón de lavado + 20 % SCI (concentración final 10 %). Se agitó con vortex, y se incubó 10-15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó *ISOTON* (Beckman Coulter) y se analizaron las células por el citómetro.

5.2 Inmunofluorescencia indirecta

Se partió de $4-8 \cdot 10^5$ células aisladas (cultivo de líneas celulares o PBMC aisladas por gradiente de ficoll) lavadas con tampón de lavado. A 50 μ L de la suspensión celular se añadió el anticuerpo primario (o un anticuerpo irrelevante al tubo de control negativo) y 50 μ L de tampón de lavado + 20 % SCI (concentración final 10 %). Se incubó durante 40 minutos en hielo y se realizaron tres lavados con tampón de lavado, dejando las células en un volumen de 50 μ L. A continuación se añadieron 50 μ L de una dilución 1/200 del anticuerpo secundario GAM-F(ab)₂-FITC (Caltag) en tampón de lavado + 20 % SCI y se incubaron los tubos durante 40 minutos en hielo. Tras 2 lavados se agregó *ISOTON* y se procedió al análisis de las células por el citómetro.

5.3 Inmunofluorescencia intracelular directa

Se lavaron aproximadamente $4-8 \cdot 10^5$ células aisladas (PBMC aisladas por gradiente de ficoll o líneas celulares) con tampón de lavado. Se descartó el sobrenadante dejando las células en aproximadamente 100 μ L, se agregaron los anticuerpos de superficie y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizó un lavado con tampón de lavado dejando las células en 100 μ L, se añadió 150 μ L de *Fixation Solution* (eBioscience) y se incubó 20 minutos a temperatura

MATERIALES Y MÉTODOS

ambiente en oscuridad. A continuación se realizaron dos lavados con 1 mL de *Permeabilization Buffer 1X* (eBioscience), se midió el volumen y se dividió el contenido en dos tubos (50-60 μL en cada uno). Se agregó a cada tubo 100 μL de *Permeabilization Buffer 1X* y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A uno de los tubos se agregó el anticuerpo marcado y al otro un control de isotipo (control negativo) marcado con el mismo fluorocromo, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se realizó un lavado con 1 mL de *Permeabilization Buffer 1X*. Se agregó *ISOTON* y se analizaron las células por el citómetro.

5.4 Inmunofluorescencia intracelular indirecta

Se utilizó este protocolo para visualizar las moléculas de CD8 marcadas con el epítipo V5 en el extremo carboxi-terminal (intracelular) transfectadas en distintas líneas celulares. Se lavaron con FACS 4-8.10⁵ células y se descartó el sobrenadante de forma que las células quedaron en un volumen de aproximadamente 100 μL . Se añadió 150 μL de *Fixation Buffer* (eBioscience) y se incubó a temperatura ambiente 20 minutos. A continuación se realizaron dos lavados con 1 mL de *Permeabilization Buffer 1X* (eBioscience). Se midió el volumen y se dividió el contenido en dos tubos (50-60 μL en cada uno), a uno de ellos se agregó el anticuerpo primario a-V5 (Invitrogen) a una concentración final 1/300 y al otro un control de isotipo (control negativo). Se agregó el anticuerpo primario (o el control de isotipo) y SCI a una concentración final del 10%, ajustando el volumen final a 150 μL con *Permeabilization Buffer 1X*. Se incubó en hielo 45 minutos. Se realizaron tres lavados con 1 mL de *Permeabilization Buffer 1X* cada vez. A continuación se agregó a todos los tubos el anticuerpo secundario a una dilución final 1/200 (GAM (Fab)₂-FITC, Caltag), en las mismas condiciones y tiempo de incubación que para el anticuerpo primario. Por último se realizaron tres lavados, el primero con *Permeabilization Buffer 1X* y luego con tampón de lavado. Se agregó *ISOTON* y se analizaron las células por el citómetro.

5.5 Marcaje con tetrámeros

Se marcaron 3.10⁶ PBMCs en un volumen de 200uL con FACS+ 10% SCI con 6 uL de CD3-PC5 (Beckman Coulter) y 10 μL de CD4-FITC (Immunotools). Posteriormente el contenido se dividió en dos tubos (100uL en cada uno). A uno de los tubos se

añadieron 10 μ L de class I iTAGTM MHC/CMV tetramer (HLA-A*0201-PE NLVPMVATV, Beckman Coulter) y al otro tubo se añadieron 10 μ L de multi-PE NEGATIVE (Beckman Coulter) como control negativo. Se incubaron los tubos 30 minutos a 20 °C en oscuridad. Posteriormente se realizó un lavado con PBS y se analizó la expresión de tetrámeros en la población CD3+ CD4-.

5.6 Estudio de las familias V β del TCR

Se siguió el protocolo IOTest[®] Beta Mark TCR V β repertoire Kit (Beckman Coulter), que permite determinar en cada tubo tres familias V β distintas utilizando solo dos colores en una combinación FITC, PE y FITC+PE. Para cubrir las 24 familias V β se prepararon 8 tubos, cada uno con $3 \cdot 10^5$ PBMCs en un volumen de 100 μ L con tampón de lavado + 10 % SCI. Cada tubo se marcó con CD3-PC5, CD4-ECD, y una de las 8 combinaciones V β -FITC, V β -PE y V β -FITC+PE. La mezcla se incubó durante 20 minutos en oscuridad a 18-25 °C y a continuación se procedió al análisis por el citómetro. Se realizó un *gate* para las células CD3+CD4+ o CD3+CD4-, y cada familia particular de V β se evaluó según la positividad para FITC, para PE, o para el doble marcaje FITC/PE.

6. Estudio bioquímico de proteínas

6.1 Extractos celulares

El pellet celular se resuspendió en tampón de lisis frío (Tris-HCl pH 7,6 10mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, EDTA 1mM, PMSF 1,5mM, mezcla completa de inhibidores de proteasa 1X, Roche) en una proporción $5 \cdot 10^6$ células/100 μ L tampón. Se incubó 45 minutos en hielo y se centrifugó 10 minutos a 15000 g. El sobrenadante se traspasó a un tubo limpio.

6.1.1 Digestión con endoglicosidasas

Los extractos proteicos fueron digeridos con endoglicosidasas con el fin de eliminar los carbohidratos unidos a Asn. Se utilizó N-Glicosidasa F (PNGaseF, NEB), una amidasa que corta entre la Asn y el primer residuo GlcNAc. Para facilitar la digestión se realizó un paso previo de desnaturalización, de esta forma se consigue eliminar la

MATERIALES Y MÉTODOS

estructura secundaria y terciaria de las glicoproteínas que podrían impedir que la endoglicosidasa alcance el sustrato. La reacción de desnaturalización se realizó en 9 μ L del sobrenadante del lisado proteico con 1 μ L del *buffer de desnaturalización 10X* (5 % SDS, 0,4M DTT, NEB), y se incubó 10 minutos a 100 °C. La reacción de digestión se realizó en un volumen final de 20 μ L agregando a la mezcla anterior 2 μ L de *reaction buffer G7 10X (NEB)*, 2 μ L NP-40 10X (para contrarrestar el efecto inhibitorio que ejerce el SDS sobre la PNGaseF), 2 μ L de PNGaseF 500 U/mL y 3 μ L de H₂O e incubando los tubos *ependorf* 4 horas a 37 °C.

6.2 Western blot

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida NuPAGE[®] Novex[®] 10% Bis-Tris Mini Gels (Invitrogen) en condiciones desnaturalizantes, con *MOPS SDS Running Buffer 1X* (Invitrogen). Para correr las muestras en condiciones reductoras se agregó al tampón de muestra (NuPAGE[®] LDS Sample Buffer, Invitrogen) un reactivo reductor (NuPAGE[®] Reducing Agent, Invitrogen). Se realizó una transferencia semi-húmeda a una membrana de nitrocelulosa (Protean Bioscience). Las membranas se bloquearon durante una hora con leche descremada al 5% en TBS (Tris 20mM pH 7,6, NaCl 150 mM) con 0,1% Tween20 (TBST), y a continuación se incubaron con los anticuerpos primarios en TBST con 3% leche a 4 °C O/N. Las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidada (Pierce) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras otra serie de lavados con TBST se realizó la visualización por quimioluminiscencia (West Pico Supersignal Kit, Pierce).

7. Estudio funcional de linfocitos humanos

7.1 Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Para realizar los estudios funcionales se partió de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), purificadas a partir de sangre heparinizada por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Las células obtenidas se lavaron con PBS y se cultivaron a 37 °C y 5% CO₂ en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FCS, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml streptomocina, y 2 mM glutamina (las condiciones específicas de estimulación se detallan más adelante para cada técnica).

7.2 Separación magnética de subpoblaciones linfocitarias

Algunos de los estudios que se detallan en los apartados siguientes se realizaron con una subpoblación purificada de linfocitos. Para separar los linfocitos T CD8+ y CD4+ de las PBMCs (ver 7.1) se realizó un primer paso de aislamiento de los linfocitos CD8+ mediante el uso de bolas magnéticas unidas a un anticuerpo anti-CD8 (Milteny Biotec), y a continuación se aislaron las células CD3+ de la población CD8+ y de la población CD8- con bolas magnéticas unidas a un anticuerpo anti-CD3 (Milteny Biotec). En los pacientes con deficiencia de CD8 se purificaron las células CD3+CD4-CD8- (DNs) y las células CD3+CD4+. En este caso se realizó una primera separación de las células CD4+ a partir de PBMCs con bolas magnéticas unidas a un anticuerpo anti-CD4 (Milteny Biotec), y una segunda separación de los linfocitos CD3+ de la población CD4+ y CD4- con bolas magnéticas unidas a anti-CD3. El grado de pureza de las poblaciones CD3+CD4+, CD3+CD8-, y CD3+DNs fue de 98%.

7.3 Cuantificación de los círculos de escisión de los reordenamientos del TCR (TRECs)

El número de TRECs es proporcional al número de linfocitos recién emigrados del timo. El análisis se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real mediante el sistema LightCycler (Roche). Se partió de muestras de DNA proveniente de células CD3+CD4+ y CD3+CD8+ (o CD3+DNs en los pacientes con deficiencia de CD8), purificadas a partir de PBMCs tal como se detalla en el apartado anterior. Para calcular el número de TRECs se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas de un plásmido que incluye el fragmento de secuencia de 375pb del círculo de escisión. Los resultados se expresaron como TRECs/ μ g DNA.

7.4 Actividad CTL en respuesta a aloantígenos

Las células PBMCs de los pacientes y controles se cultivaron en medio RPMI (suplementado con 10% FCS, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml streptomycin, y 2 mM glutamina) a una densidad de $2 \cdot 10^6$ cels/mL. Para generar las CTLs específicas de aloantígeno, se cocultivaron las células PBMCs con células R69-LCL tratadas con mitomicina (2 horas a 25 μ g/ml) en una relación 1/0,7 durante 6 días y en presencia de

MATERIALES Y MÉTODOS

30 U/ml de IL-2 (Biosource International). Las células R69-LCL expresan antígenos HLA diferentes a los de las células de los pacientes y controles. Transcurridos 6 días se realizó el ensayo de citotoxicidad, enfrentando las células diana R69-LCL (marcadas con ³H-timidina O/N, Amersham) con las CTLs de pacientes y controles generadas en el cultivo alogénico (células efectoras). Para ello, se realizó una separación magnética de las células T CD8+ de los controles o las células T DN8 de los pacientes con deficiencia de CD8 (ver 7.2), y a continuación dichas células se mezclaron con las células diana marcadas (1.10⁴ cts/pozo) en un rango de relaciones 25:1-1:1, cada una por triplicado, y en un volumen final de 200 µL. La actividad citotóxica es proporcional al porcentaje de fragmentación del DNA en las células diana tras 6 horas de contacto con las células efectoras, que a su vez se compara con la liberación de ³H-timidina que se produce tras la lisis química de las células diana. La lisis se llevó a cabo añadiendo 25 µL de tampón de lisis (TritonX-100 2%/Tris-HCl (pH 8.0)/EDTA (0.5 M) a cada pocillo e incubando la placa 10 minutos a 37 °C. A continuación, se centrifugó la placa 10 minutos a 1200 rpm, se transvasaron 25 µL del SN a una placa réplica, se recolectó el contenido con el filtrador (SKATRONAS), y se midió la radiación beta emitida por cada filtro en un contador de centelleo (Tri Carb 2100 TR Packard). Para determinar el porcentaje máximo de liberación de ³H-timidina, de algunos pocillos se transvasaron 25 µL de la suspensión de células diana. El porcentaje específico de fragmentación del DNA se determinó como:

$$\% \text{ fragmentación} = (\text{c.p.m muestra} - \text{c.p.m fragmentación espontánea}) / (\text{c.p.m liberación máxima} - \text{c.p.m fragmentación espontánea}) \times 100.$$

La fragmentación espontánea se determinó en pocillos que contienen el sobrenadante de las células diana que no estuvieron en contacto con las células efectoras, mientras que la liberación máxima se determinó en los pocillos que contienen la suspensión de células diana.

7.5 Actividad CTL dependiente de la vía de secreción de gránulos

La actividad citotóxica dependiente de la liberación de gránulos de linfocitos T CD8+ se realizó evaluando la capacidad de lisis de células diana L1210.3 (carentes de Fas). Estas células expresan receptores Fc, de forma que en presencia de anti-CD3, el anticuerpo hace de “puente”, uniéndose a la célula diana y activando a la célula efectora (Anel 1994). Se extrajeron las PBMCs de los pacientes y controles, y se

cultivaron en presencia de PHA (2 µg/mL) e IL-2 (40 UI/mL) durante 24 horas. El cultivo se mantuvo durante 5 días más con 40 UI/mL de IL-2. El día del ensayo se incubaron las células diana con 200 µCi ⁵¹Cr (PerkinElmer) durante 1 hora, se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI completo. Paralelamente se determinó el porcentaje de linfocitos T CD8+ presente en las células mononucleares por citometría de flujo y se realizaron diluciones para obtener distintas relaciones células T efectoras CD8+ : células diana (10:1; 1:1; 0,1:1; 0,01:1). Se distribuyeron las células diana y las diferentes diluciones de células efectoras por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo en U y se añadió el anticuerpo anti-CD3 (OKT3, 10 µg/mL). El volumen final por pocillo fue de 200 µL. A las 4 horas se centrifugó la placa a 1200 rpm y se extrajeron 100 µL de sobrenadante de cada pocillo para determinar la cantidad de ⁵¹Cr liberado. El porcentaje de citotoxicidad se calculó según la fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = (\text{c.p.m muestra} - \text{c.p.m liberación espontánea}) / (\text{c.p.m lisis máxima} - \text{c.p.m liberación espontánea}) \times 100.$$

La lisis espontánea se calculó en los pocillos que contenían solo células diana con medio de cultivo y la lisis máxima en los pocillos que contenían células diana y SDS 0,1%.

7.6 Ensayo de actividad NK

La actividad citotóxica de las células NK se evaluó midiendo su capacidad para lisar las células diana K562. Las células diana se marcaron con 200 µCi de ⁵¹Cr (PerkinElmer) durante 1 hora, se lavaron tres veces con PBS, y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI completo a una concentración de $0,4 \cdot 10^6$ células/mL. La suspensión celular se distribuyó en una placa de 96 pocillos de fondo en U (40.000 cts/100 µL/pocillo). Paralelamente, se aislaron las células mononucleares (pacientes y control) y se ajustaron a una concentración de $4 \cdot 10^6$ cts/mL. Se realizó una serie de diluciones seriadas para obtener las distintas relaciones células efectoras/células diana (10:1; 5:1; 2,5:1; 0,63:1; 0,31:1). De cada dilución de células efectoras se distribuyeron 100 µL en los pocillos de la placa que contiene las células K562, por triplicado. A algunos pocillos se añadió medio de cultivo en lugar de células efectoras para determinar la liberación espontánea, mientras que la lisis máxima se determinó en pocillos que contenían las células diana en presencia de SDS al 0,1 %. Tras 4 horas de incubación, se centrifugó la placa a 1200 rpm y se extrajeron 100 µL de

MATERIALES Y MÉTODOS

sobrenadante de cada pocillo para determinar la cantidad de ^{51}Cr liberado. El porcentaje de citotoxicidad se calculó según la fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = (\text{c.p.m muestra} - \text{c.p.m liberación espontánea}) / (\text{c.p.m lisis máxima} - \text{c.p.m liberación espontánea}) \times 100$$

7.7 Ensayo CD107a

La expresión de la Proteína 1 Asociada a la Membrana de los Lisosomas (CD107a) en la superficie de las células NKs activadas es un marcador de su capacidad para liberar gránulos citotóxicos. Se extrajeron las PBMCs y se cultivaron en presencia de IL-2 (50 U/mL) durante 24 horas a 37 °C y 5% CO₂. Al día siguiente se ajustaron las células de cada paciente a 2.10⁶ cts/mL y se distribuyeron 100 µL en cada pocillo (2 por paciente) de una placa de 96 de fondo en U. Se ajustaron las células K562 a 2.10⁶ cts/mL y se añadieron 100 µL al segundo pocillo, mientras que al primero se añadieron 100 µL de medio de cultivo y se lo utilizó como control de degranulación espontánea (sin estímulo). En todos los pocillos se añadieron 5 µL de CD107a-PE (BD), y se incubó 1 hora a 37 °C y 5% CO₂. Se agregaron 5µL de Monensina 2mM (inhibidor del proceso de tránsito retrógrado desde la membrana hacia el Golgi, Sigma), y se incubó durante 2 horas más. Se lavó el contenido de los pocillos con tampón de lavado (PBS, 3 % FCS, 0,1 % azida sódica) y se marcaron las células con CD16 y CD3. La expresión de CD107a se analiza en las células CD3⁻CD16⁺. En los individuos control se observa un 20-40 % de incremento en la expresión de CD107a de las células estimuladas con K562 respecto de las no estimuladas.

7.8 Ensayo de apoptosis inducido por Fas

Se aislaron las PBMCs de pacientes y controles y se cultivaron en RPMI completo con 2 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA, Sigma) durante 24 horas. A continuación se lavaron y se cultivaron en presencia de IL-2 (50 U/mL, Proleukin[®]) durante otros 5 días. Transcurrido este tiempo, se ajustaron las células a 4.10⁵ cts/mL y se distribuyeron en placas de 48 pozos (1 ml/pozo). A la mitad de los pocillos se añadió 1 µL del anticuerpo anti-Fas CH11 (Coulter). Tras 20 horas se analizó el porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo. Para ello se recogió el contenido de los pocillos, se lavaron las células con el tampón de anexina-V 1X (Bender MedSystems), y

se añadieron 2 μL de anexina-V (Bender MedSystems) y 150 μL del tampón de anexina-V 1X. La anexina-V reconoce la fosfatidilserina traslocada a la cara externa de la membrana celular en las células apoptóticas. Tras 15 minutos de incubación a TA, se añadieron 150 μL más de tampón de anexina 1X y 5 μL de yoduro de propidio (Bender MedSystems). A continuación se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células negativas para yoduro de propidio y positivas para anexina-V.

Paralelamente a la tinción con anexina-V se realizó un recuento de las células con azul de Tripán con parte del contenido de los pozos. En todos los casos se compara la apoptosis basal (sin anticuerpo), con la producida por la adición del anticuerpo anti-Fas (CH11). Como control de la técnica se empleó la línea T Jurkat que es extremadamente susceptible a la apoptosis inducida por Fas.

IV. RESULTADOS

1. Estudio de pacientes con Deficiencia Familiar de CD8

1.1 Antecedentes Clínicos e Inmunológicos

La Deficiencia Familiar de CD8 se describió por primera vez en un individuo varón de 25 años (II4 en la familia A, Figura IV.1), de origen gitano y procedente de una familia consanguínea (De la Calle-Martín 2009, De la Calle-Martín 2001). La enfermedad se manifestó como infecciones bacterianas recurrentes, principalmente de las vías respiratorias, que comenzaron en la niñez. El paciente presentaba bronquiectasias diseminadas, y no había requerido hospitalización hasta los 25 años cuando ingresó por un cuadro de disnea respiratoria severa. El análisis de cultivo de esputo fue positivo para *Haemophilus influenzae*, mientras que en dos cuadros infecciosos respiratorios posteriores se detectó *Pseudomonas aeruginosa*.

La inmunidad humoral estaba conservada, con niveles de inmunoglobulinas normales y subclases de IgG también dentro de la normalidad. Presentaba serología IgG positiva para diferentes virus como CMV y Herpes zoster, así como también para otros gérmenes y antígenos vacunales como toxoide tetánico, toxoplasma y *Mycoplasma pneumoniae*. La serología para VIH, EBV, *Legionella pneumophila*, *Aspergillus* y *Brucella* era negativa. Los niveles de complemento y la capacidad oxidativa de los neutrófilos también eran normales. La respuesta celular se analizó mediante el estudio de la proliferación de los linfocitos del paciente frente a distintos estímulos mitogénicos, observándose valores normales de proliferación frente a PHA, ConA, PWM, OKT3 y superantígenos. También estaba conservada la respuesta celular alorreactiva y al antígeno toxoide tetánico.

RESULTADOS

El fenotipo linfocitario reveló una ausencia total de células CD8+, tanto de linfocitos T CD3⁺ como de células NKs (CD3⁻). El número absoluto de leucocitos y linfocitos era normal, como así también el porcentaje de linfocitos B, células NKs y linfocitos T CD4+. Además de estar ausente en la membrana celular, la cadena α de CD8 era indetectable mediante tinción intracelular y estudios de western blot. Tampoco se detectaba CD8 soluble en suero (valores normales 200-300 U/ml).

Tras excluir otras inmunodeficiencias como el déficit de ZAP70 o de TAP, en las cuales esta reportada una disminución de linfocitos T CD8+, se estudiaron los genes que codifican para las cadenas α y β del correceptor CD8. Primero se estudió el RNA de los genes *CD8A* y *CD8B*, detectándose mensajero en ambos casos. Cuando se analizaron por secuenciación los productos de amplificación de los genes *CD8A* y *CD8B*, se encontró una mutación puntual G>A en el nucleótido 331 del exón 2 del gen *CD8A*, que produce un cambio de glicina a serina en la posición 90 de la subunidad CD8 α . Si se considera la región del péptido señal, la posición afectada por el cambio es la 111, nomenclatura que se seguirá de aquí en adelante.

A partir del año 2001 las infecciones respiratorias se agravaron debido a reinfecciones continuas como consecuencia de las extensas bronquiectasias, detectándose *Pseudomona aeruginosa* en el esputo en varias ocasiones. La función ventilatoria del paciente se deterioró hasta el punto de requerir oxígeno-terapia permanente. El paciente murió antes de que fuera posible realizar un trasplante de pulmón. Dos hermanas del paciente (II5 y II7, Figura IV.1) tenían la mutación en homocigosis y en el momento de la presentación se encontraban asintomáticas.

1.2 Descripción de nuevos casos clínicos

La paciente II5 de la familia A es una mujer de 35 años (A-II5, Figura IV.1), hermana del paciente en el que se describió inicialmente la mutación y, excepto por una leve predisposición a desarrollar infecciones del tracto respiratorio, prácticamente no presenta síntomas. La paciente II7 de la misma familia aún no ha presentado clínica.

La paciente III1 de la familia B (B-III1, Figura IV.1) es una niña de 16 años de origen gitano que fue derivada al Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre de Madrid debido a infecciones respiratorias recurrentes desde la infancia y problemas de desarrollo (Mancebo 2008). Al mes de edad sufrió un episodio de bronquiolitis y a los dos meses de edad un segundo episodio que requirió hospitalización y en el cual se

detectó la presencia de RSV. Sufrió diversos episodios de neumonía y otitis, junto con infecciones del tracto respiratorio inferior entre el primer año y los 4 años de edad. En una ocasión se detectó serología positiva para el virus de la parainfluenza 3. A los 4 años ingresó al hospital y se le diagnosticó asma, infecciones de las vías altas y una atelectasia pulmonar en el lóbulo inferior izquierdo. En el último año ha sufrido dos episodios de neumonía, junto con infecciones severas del tracto respiratorio. Las infecciones se han resuelto correctamente con antibióticos.

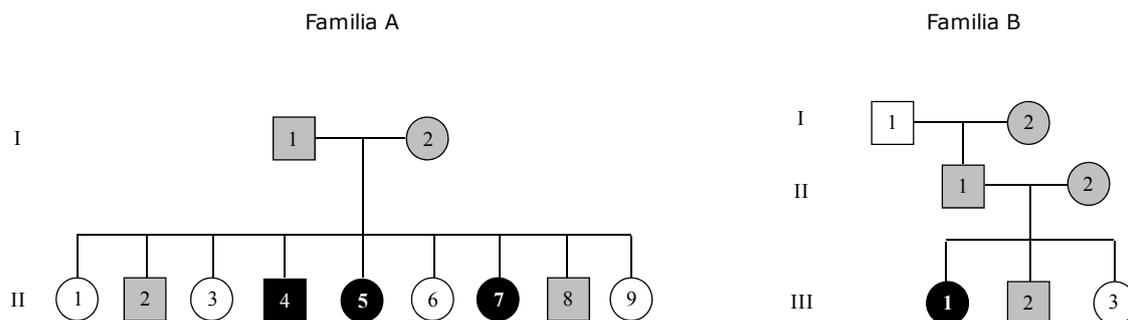


Figura IV.1: Árboles genealógicos de las dos familias estudiadas. Los miembros masculinos se indican en símbolos cuadrados, los femeninos con círculos. Los individuos portadores de la mutación están simbolizados en gris y los que poseen ambos alelos mutados se representan en negro.

1.3 Estudio inmunológico de los nuevos casos

1.3.1 Inmunidad Humoral

El estudio de la inmunidad humoral en las pacientes A-II5 y B-III1 reveló valores séricos normales de IgG, IgA, IgM y subclases de IgG. La proliferación linfocitaria frente a estímulos mitogénicos y antígeno específica fue normal. La serología fue positiva para CMV y rubeola, y en el caso de la paciente B-III1 también para EBV, mientras que en ambos casos fue negativa para HIV, hepatitis A,B,C, sífilis y toxoplasma.

1.3.2 Estudio de las poblaciones linfocitarias

En ambas pacientes el recuento y el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias era normal, excepto por una ausencia absoluta de células CD8+, tanto de linfocitos T CD3+ como de células NKs (CD3-), como puede observarse en la Figura IV.2. Normalmente, dentro de la población de linfocitos CD3+ se observan dos núcleos celulares: uno de mayor expresión de CD8 y que corresponde a la forma

RESULTADOS

heterodimérica $\alpha\beta$ (indicado como “a” en el control), y otro de menor expresión que corresponde al homodímero $CD8\alpha\alpha$ (indicado como “c”); mientras que algunas células NKs expresan el homodímero $\alpha\alpha$ (núcleo “b” en el control).

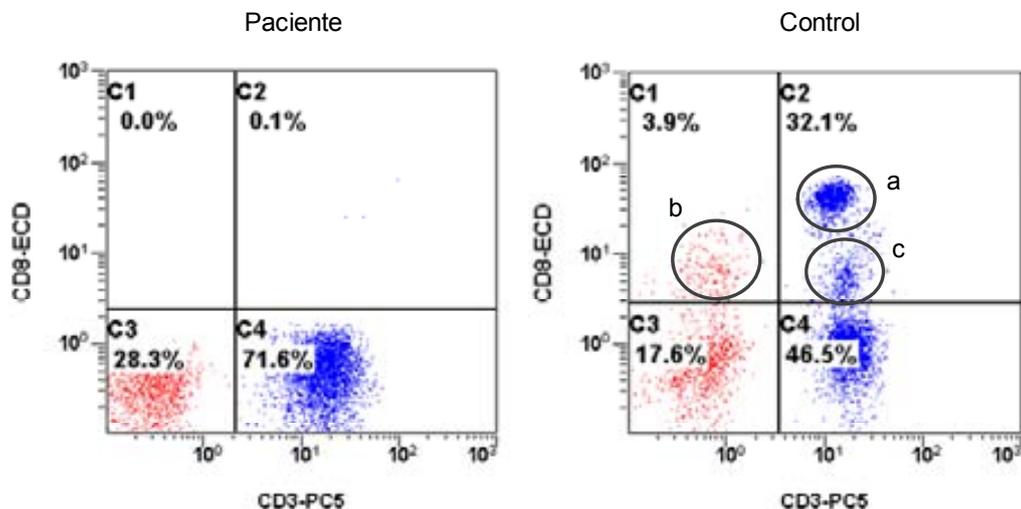


Figura IV.2: Análisis de la expresión de CD8 en la superficie de los linfocitos de una de las pacientes (Izquierda) y un individuo control (derecha). En el control se observan 3 poblaciones de células CD8+: a) linfocitos T $CD8\alpha\beta$, b) células NKs, c) linfocitos T $CD8\alpha\alpha$. En el paciente no se detecta expresión de CD8 ni en linfocitos T ni en células NKs.

Ninguna de estas poblaciones está presente en las pacientes, indicando que no existe expresión de CD8 como heterodímero $\alpha\beta$ ni como homodímero $\alpha\alpha$.

1.3.3 Análisis de la expresión de $CD8\alpha$ y $CD8\beta$ por Western Blot

En el primer paciente con deficiencia de CD8 no fue posible detectar la expresión del correceptor en la superficie celular con un extenso panel de anticuerpos monoclonales anti-CD8 (de la Calle-Martín 2001). Sin embargo, era importante determinar si se detectaba CD8 en las células de los pacientes con anticuerpos no dependientes de la conformación. Para investigar esta posibilidad se realizaron estudios de western blot con extractos de células mononucleares de una de las pacientes, en condiciones desnaturalizantes y reductoras. La detección se realizó con dos anticuerpos dirigidos contra la cadena α de CD8, N1 contra la región amino, y 144-B contra la cola citoplasmática, y un anticuerpo específico de cadena β (clon 5F2). Los tres anticuerpos están recomendados para realizar estudios de western blot en condiciones desnaturalizantes.

El extracto de la paciente es negativo tanto para CD8 α (Figura IV.3 A y B) como para CD8 β (Figura IV.3 C). En la Figura IV.3 D se observan los resultados para los mismos extractos (control y paciente) realizando la detección con un anticuerpo anti- β actina. Como puede observarse, los niveles de β actina son comparables en la paciente y en el control, indicando que la falta de detección de CD8 en la paciente no se debe a una deficiencia de proteína en el extracto celular.

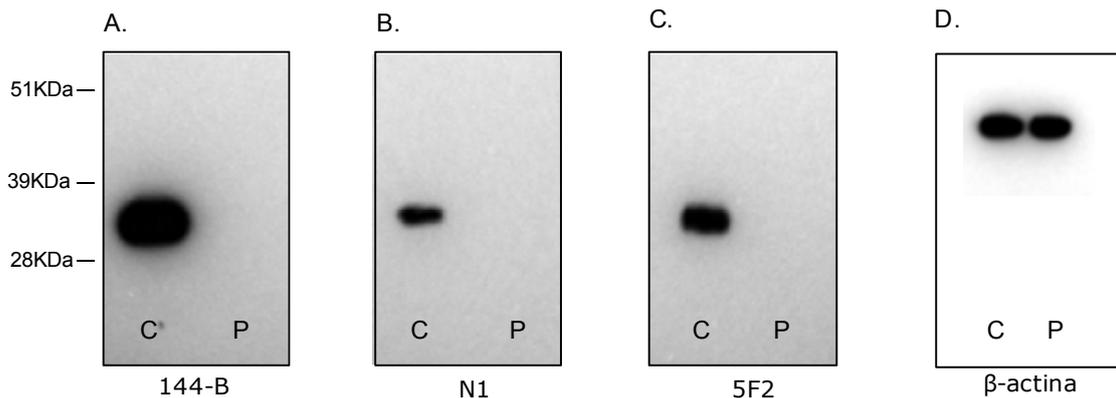


Figura IV.3: Análisis de las subunidades α y β de la glicoproteína CD8 por WB en un individuo control (C) y en un paciente con déficit de CD8 (P). A: Detección con el AcMo 144-B, dirigido contra la cola citoplasmática de CD8 α . B: Detección con el AcMo N1, dirigido contra la región amino de CD8 α . C: Detección con el AcMo 5F2, específico de CD8 β .

En conclusión, no se detecta el correceptor a nivel proteico ni en la superficie de los linfocitos ni en extractos de células mononucleares, con ninguno de los anticuerpos probados, tanto dirigidos contra el dominio *IgV-like* como contra otras partes de la molécula.

1.3.4 Estudio del fenotipo de las células CD3+CD4-CD8-

Al igual que el primer caso descrito de déficit de CD8, las dos pacientes mostraron un número de células TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- (DN) superior al valor normal (10% paciente A-II5, 9-16 % paciente B-III1, valor de referencia 0.1-2%). Para evaluar la posibilidad de que estas células TCR $\alpha\beta$ DN se correspondan con la población potencialmente CD3+CD8+, en caso de poder expresarse el correceptor, se analizó el fenotipo de la población CD3+CD4- de los pacientes con déficit de CD8 y se comparó con la población CD3+CD8+ de 4 individuos control. Las células CD3+CD4- *naive*, como puede observarse en la Tabla IV.1, se encuentran muy disminuidas en los pacientes respecto de los controles. Las células CD3+CD4- de la paciente 1 muestran

RESULTADOS

principalmente un fenotipo de células efectoras (CD27^{low/-}CD28⁻CD45RA^{+/-}), mientras que en la paciente 2 predomina el fenotipo de células de memoria efectoras (CD27⁺CCR7⁻CD45RA⁻). Concordando con estos resultados, el 50% y el 30% de las células CD3⁺CD4⁻ fueron Perforina⁺, respectivamente, en la paciente 1 y en la paciente 2. En la población CD3⁺CD8⁺ de los individuos control, el porcentaje de células Perforina⁺ fue, en promedio, del 20%.

Tabla IV.1: Estudio del fenotipo de las células TCRαβ DN en las dos pacientes con Deficiencia Familiar de CD8 y en cuatro individuos control.

Fenotipo Linfocitario	Controles (n=4)	Paciente 1	Paciente 2
Células <i>naive</i> CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	39.3±13.6	8.2	4.6
Efectoras poco diferenciadas CD27 ^{low} CD28 ⁻ CD45RA ^{+/-}	5.6±3.4	23.6	10.8
Efectoras altamente diferenciadas CD27 ⁻ CD28 ⁻ CD45RA ^{+/-}	25.7±10.3	40.4	17.3
Células de memoria totales CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD45RA ⁻	20.7±2.7	17.3	52.4
Células de memoria centrales CD27 ⁺ CCR7 ⁺ CD45RA ⁻	9.8±5.1	5.7	6.3
Células de memoria efectoras CD27 ⁺ CCR7 ⁻ CD45RA ⁻	14.3±7.2	22.5	52.1

Estos resultados indican que las células TCRαβ DN de los pacientes están diferenciadas hacia el linaje de linfocitos T citotóxicos, y con una escasa representación de células *naive* (inferior al 10 % en ambos casos en comparación con un valor de referencia cercano al 40% para la población CD3⁺CD8⁺).

1.3.5 Análisis del repertorio Vβ

Se estudió la frecuencia de distribución de las familias TCR Vβ por citometría de flujo en los linfocitos T de una de las pacientes con deficiencia primaria de CD8. En las células CD3⁺CD4⁺ de la paciente B-III1, la distribución de las 24 familias Vβ evaluadas fue similar a la de las células CD3⁺CD4⁺ de individuos control. Sin embargo, el repertorio Vβ en las células CD3⁺DN de la paciente mostró una mayor proporción de la

familia V β 3 (17,6%) respecto a los valores en células CD3+CD8- de individuos control (4,3 \pm 3,1). Además 12 de las 24 familias V β estudiadas se encontraron subrepresentadas en la población CD3+DN de la paciente. Estos resultados son consistentes con un repertorio sesgado de familias TCR V β en la población de células T citotóxicas de la paciente.

1.3.6 Análisis de la frecuencia de los círculos de escisión de los reordenamientos del TCR (TRECs)

El número de linfocitos T recién emigrados del timo puede estimarse mediante la cuantificación de los TRECs, puesto que el número de TRECs es inversamente proporcional al número de divisiones que sufre un linfocito T una vez que ha emigrado del timo (Hazenberg 2001). El análisis se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real con muestras de DNA provenientes de células CD3+DN y CD3+CD4+ de los pacientes con deficiencia de CD8, en comparación con células CD3+CD8+ y CD3+CD4+ de individuos control. Cada paciente se comparó con un control de edad similar (C1 y C2). En los linfocitos T CD4+ de los pacientes (A-II5 y B-III1) se encontró un número de TRECS (expresado como TRECS/ μ g DNA) similar a los respectivos controles (A-II5:280, C1:340; B-III1:1870, C2:1130). Sin embargo, en los linfocitos T DN de los pacientes se encontraron niveles de TRECS mucho más bajos que en los linfocitos T CD8+ de los individuos control (A-II5: indetectable, C1:130; B-III1:60, C2:960). Los bajos niveles de TRECS en los linfocitos T DN de los pacientes indican una expansión importante a nivel periférico de esta población, y sugiere una baja eficiencia del timo para proveer un número adecuado de células en el compartimento *naïve*. Estos resultados concuerdan con los datos fenotípicos en la población CD3+CD4-CD8-, potencialmente citotóxica pero con bajos niveles de células *naïve*, y podrían justificar la alteración en el repertorio V β de esta población.

1.3.7 Estudio funcional

1.3.7.1 Análisis de la capacidad citotóxica

La concordancia del fenotipo de las células CD3+DN de los pacientes con células T citotóxicas efectoras, sugiere que dichas células podrían tener conservada su función. Para evaluar esta posibilidad, se generaron células CTLs específicas de

RESULTADOS

aloantígenos a partir de las PBMCs de los pacientes y de individuos control. Para ello se incubaron dichas PBMCs con células LCL R69 tratadas con mitomicina durante 6 días y en presencia de IL-2. Estas células poseen antígenos HLA diferentes a los de las células de los pacientes y los controles (Lopez 1994, Paradela 1998), y son prácticamente insensibles a la apoptosis inducida por Fas. Una vez expandidas las células específicas para los aloantígenos, se separaron las células CD3+DN de los pacientes o las células CD3+CD8+ de los controles (células efectoras), y se incubaron con las células R69 previamente marcadas con ^3H -timidina (células diana). La actividad citotóxica es proporcional al porcentaje de fragmentación del DNA en las células diana tras 6 horas de contacto con las células efectoras. En los individuos control, las células CD3+CD8+ se expandieron en gran medida después de la respuesta aloantigénica, representando casi el 99% del total de PBMCs. Por el contrario, las células CD3+DN de los pacientes fueron incapaces de expandirse tras el estímulo alogénico. En condiciones en las que las células efectoras representan un exceso importante respecto de las células diana (relaciones efector: diana 25:1; 10:1; 5:1), la citotoxicidad fue similar en la paciente B-III1 y en los controles. Sin embargo, cuando las células efectoras se encuentran a similares concentraciones que las células diana (2,5:1 y 1:1), la respuesta citotóxica fue significativamente menor en la paciente B-III1 respecto de los individuos control (Figura IV.4). Debido a limitaciones de la muestra, en la paciente A-II5 solo se pudo realizar el ensayo con bajas concentraciones de células efectoras (relaciones efector: diana 2:1 y 0,5:1), observándose una respuesta citotóxica muy inferior en la paciente respecto de los controles.

Estos resultados sugieren que los linfocitos T DN de los pacientes deficientes en CD8 tendrían capacidad citotóxica en condiciones en las que las células efectoras se encuentran en exceso, pero la capacidad efectora se vería drásticamente afectada en condiciones limitantes. Por otra parte, la ausencia de una expansión *in vitro* de la población CD3+DN de los pacientes durante la respuesta alogénica podría significar un estado de senescencia de esta población, secundario a la expansión *in vivo* como consecuencia de estímulos antigénicos.

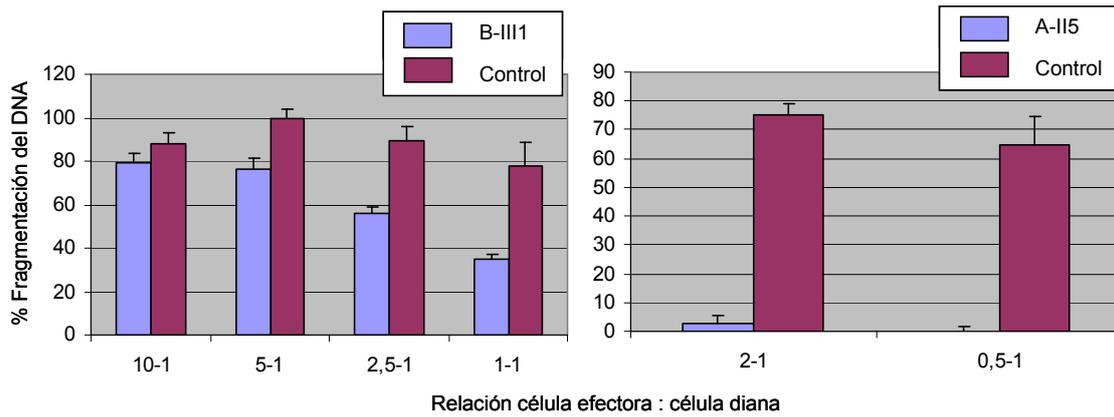


Figura IV.4 : Respuesta citotóxica contra aloantígenos. Se aislaron las células CD3+DN de los pacientes o las células CD3+CD8+ de los controles del cultivo alogénico y se cultivaron con células R69-LCL previamente marcadas con ³H-timidina en las distintas proporciones, por triplicado, que se indican en la figura. La actividad citotóxica es proporcional al porcentaje de fragmentación del DNA en las células diana tras 6 horas de contacto con las células efectoras, que a su vez es proporcional a la liberación de ³H-timidina que se produce tras la lisis química de las células diana.

% fragmentación = (c.p.m muestra – c.p.m fragmentación espontánea) / (c.p.m liberación máxima – c.p.m fragmentación espontánea) x 100. La fragmentación espontánea se determinó en pocillos que contienen el sobrenadante de las células diana que no estuvieron en contacto con las células efectoras, mientras que la liberación máxima se determinó en los pocillos que contienen la suspensión de células diana.

1.3.7.2 Análisis de la capacidad de generar una respuesta restringida para HLA-I

Hemos visto que las células CD3+DN de los pacientes deficientes en CD8 son capaces de generar una respuesta aloespecífica, aunque con mayor dificultad que los linfocitos T CD8+ de los individuos control. La función “fisiológica” de las CTLs es, sin embargo, eliminar células infectadas y células tumorales. Para evaluar si en ausencia de CD8 los linfocitos T DN son capaces de generar una respuesta antiviral restringida para HLA-I, estudiamos en una de las pacientes la presencia de células CD3+CD4- capaces de unir tetrámeros fluorescentes formados por complejos HLA-I / péptido viral. Puesto que la paciente B-III1 tiene el alelo HLA-A*0201 y presenta una serología muy positiva para CMV, estudiamos en dicha paciente el reconocimiento de tetrámeros HLA-A*0201-CMV por parte de las células CD3+CD4-. Paralelamente, se evaluó la presencia de células CD3+CD4- tetrámero positivas en un individuo control HLA-A*0201 con serología positiva para CMV. En ambos casos se utilizaron como controles negativos tetrámeros de HLA-A*0201 unidos a un péptido irrelevante. En la Figura IV.5 puede observarse que en un individuo control las células tetrámero positivas representan un 1,9% del total de células CD3+CD4-, un porcentaje muy elevado teniendo en cuenta que solo estamos viendo las células que reconocen un péptido específico del CMV. En la paciente B-III1, las células CD3+CD4- tetrámero⁺ representan un 1,1% del total de

RESULTADOS

células CD3+CD4-, un porcentaje considerable a pesar de ser inferior al control. Estos resultados demuestran que, aún en ausencia del correceptor CD8, se generan células T con TCRs específicos para un péptido viral determinado y cuyo reconocimiento se encuentra restringido por las moléculas de HLA-I, en este caso HLA-A2.

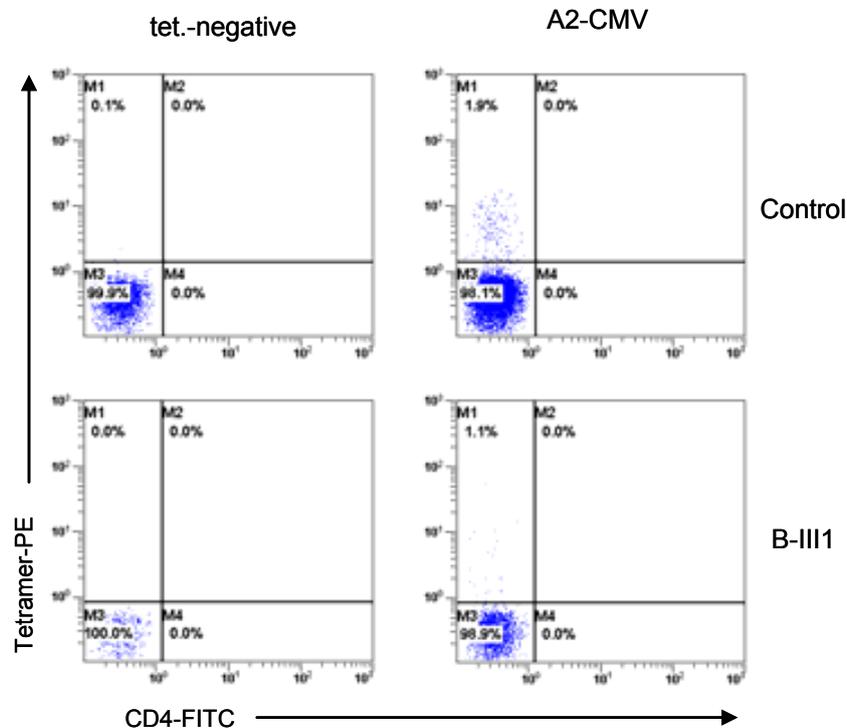


Figura IV.5: Las PBMCs de un individuo control (Panel superior) y de la paciente B-III1 se marcaron con CD3-PC5, CD4-FITC y HLA-A*0201-PE NLVPMVATV (A2-CMV, Derecha) o multi-PE NEGATIVE (tet.-negative, Izquierda). La población tetrámero⁺ se analizó en las células CD3⁺CD4⁻.

Un dato que llama la atención, es que en la paciente B-III1 el valor de la intensidad de fluorescencia media (MFI) es mayor que en el individuo control (B-III1 MFI= 13; Control MFI= 4,9), lo cual indicaría que las células han pasado la selección positiva compensado la ausencia de CD8 con TCRs de mayor afinidad.

1.3.8 Análisis del gen CD8A

La paciente II-5 de la familia A fue diagnosticada de Deficiencia Familiar de CD8 al encontrarse la misma mutación Gly111Ser que en su hermano, el primer paciente descrito con esta enfermedad (de la Calle-Martín 2001). En la paciente B-III1, la total ausencia de células CD8+, la clínica, el origen étnico y los datos de consanguinidad, sugerían un Déficit Familiar de CD8 como causante de la enfermedad. Por ello se procedió al análisis del gen *CD8A* en dicha paciente. Se amplificaron los exones 1 y 2

del gen *CD8A* (*primers* CD8 Met y CD8 intron 2) y se secuenció el producto de amplificación. Se detectó la mutación G>A en el nucleótido 331 del exón 2 (331C>A), la misma que afectaba a la primera familia, y que origina el cambio de la glicina 111 a serina en la proteína CD8 α (Gly111Ser). La Figura IV.6 muestra la secuencia correspondiente a un individuo control (a la izquierda), de un individuo portador de la mutación perteneciente a la familia A (en medio), y la secuencia de la paciente homocigota para la mutación, a la derecha.

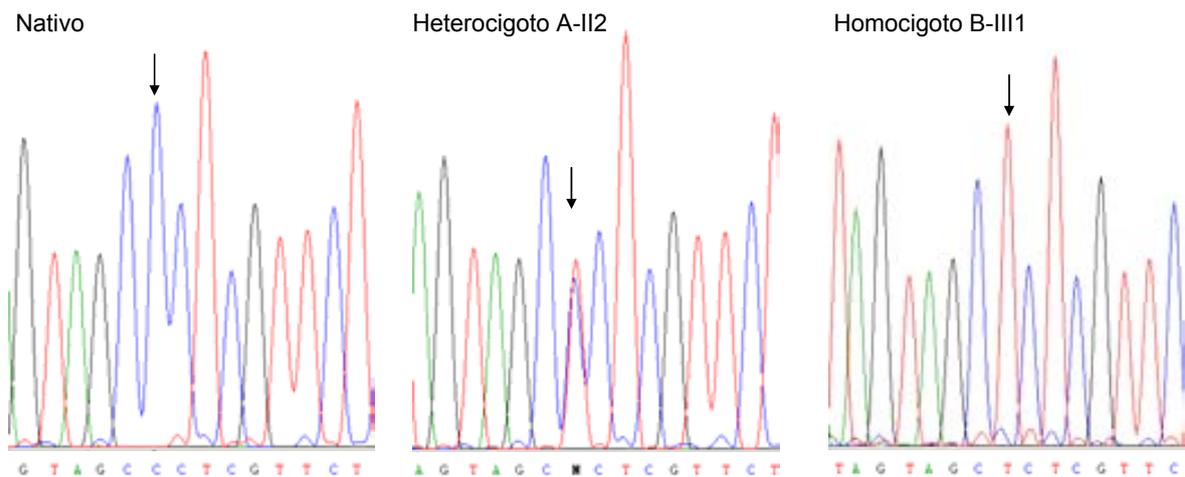


Figura IV.6: Análisis por secuenciación de la amplificación a partir de DNA genómico de *CD8A*. Izquierda: Secuencia nativa. Centro: secuencia heterocigota para la mutación 331C→A. Derecha: Secuencia homocigota para la mutación 331C→A.

1.4 Estudio de la incidencia de la mutación 331G>A en la población gitana española y en la población general

La existencia de la misma mutación en *CD8A* en una nueva familia no relacionada con la original, pero que compartía los datos de consanguinidad y la pertenencia a la etnia gitana, nos llevó a investigar la incidencia de la mutación en esta población. La mutación 331G>A genera un sitio de restricción adicional para el enzima AluI dentro de la zona de amplificación comprendida entre los exones 1 y 2 del gen *CD8A*, de forma que el análisis del patrón de digestión con AluI de los productos amplificados permite detectar la mutación. Se analizaron 82 muestras de individuos españoles de etnia gitana y se encontró un sujeto heterocigoto y, por lo tanto, portador de la mutación. Asimismo se estudiaron 100 muestras de controles sanos de población no gitana y no se encontró la mutación en ninguna de ellas. En la Figura IV.7 se muestran los tres posibles patrones de restricción según pertenezcan las muestras a

RESULTADOS

individuos homocigotos para la mutación 331G>A, heterocigotos, o nativos. Por este método se analizaron también los familiares directos de la paciente B-III1 con déficit de CD8, encontrándose que los padres, un hermano, y la abuela paterna de la paciente eran portadores de la mutación 331G>A (Mancebo 2008). El estudio se amplió a un grupo de 242 individuos españoles de etnia gitana y en uno de ellos se encontró nuevamente la mutación en heterocigosis, mientras que en individuos gitanos no españoles (492 individuos), no se encontró la mutación.

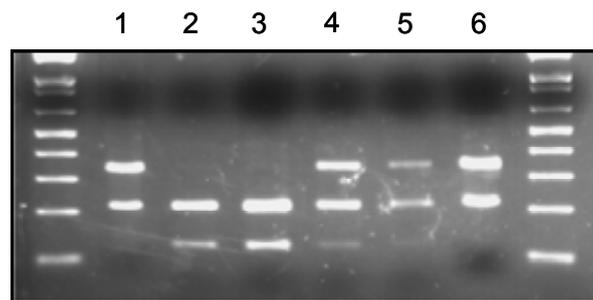


Figura IV.7: Búsqueda de la mutación 331G>A mediante el análisis del patrón de digestión AluI. Se amplificaron los exones 1 y 2 del gen *CD8A* (primers CD8 Met y CD8 Int2, 555pb), y se digirieron los productos de amplificación con AluI. En los individuos nativos (carriles 1 y 6) se obtienen dos fragmentos, uno de 216 pb y otro de 339 pb. En los individuos homocigotos para la mutación (carriles 2 y 3) se genera un sitio de restricción extra y se obtienen bandas de 216 pb, 212 pb y 127 pb. También se muestra el patrón heterocigoto (carriles 4 y 5).

Estos resultados y el hecho que todos los pacientes con deficiencia de CD8 pertenezcan a la etnia gitana de origen ibérico, sugiere que la mutación podría estar confinada a esta población.

2. Caracterización molecular de la glicoproteína mutante $CD8\alpha^{Ser}$

El cambio de un solo aminoácido de glicina a serina en la glicoproteína $CD8\alpha$ no parece justificar por sí mismo la falta total de expresión del correceptor CD8 en la superficie de los linfocitos T y las células NKs de los pacientes. Sin embargo, la glicina en la posición 111 del dominio inmunoglobulina de $CD8\alpha$ (*IgV-like*) está conservada en todos los vertebrados. En el caso de la cadena β , también está conservada la glicina en la posición homóloga en todas las clases de vertebrados, a excepción del ratón. La molécula CD7, una glicoproteína perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que presenta una elevada homología a CD8, también tiene una glicina conservada en la posición equivalente en CD8. Todas estas moléculas

comparten el motivo G-Y-Y-F-C dentro del dominio *IgV-like*. La glicina es el aminoácido más pequeño, y al ubicarse 4 posiciones antes de la cisteína, permitiría el cierre correcto del dominio. Los anticuerpos monoclonales contra CD8 α humanos, aptos para citometría de flujo, están dirigidos contra el dominio inmunoglobulina. Si la estructura de dicho dominio se encontrase alterada, no existiría reconocimiento de CD8 α^{Ser} por parte de ninguno de los anticuerpos α -IgV disponibles a pesar de que la molécula mutante se expresara en la superficie celular.

2.1 Diseño de construcciones UCHL/CD8

Para corroborar esta hipótesis se diseñaron construcciones de las variantes nativa (glicina) y mutante (serina) de CD8 α humano, en las que se añade un péptido marcador contra el cual existen anticuerpos monoclonales. La construcción se diseñó uniendo un péptido derivado de la molécula CD45RO humana (epítipo UCHL-1) al extremo amino terminal (extracelular) de CD8, como se detalla en el apartado 3.1 de metodología. La molécula quimérica UCHL-CD8 queda codificada por el plásmido pUCHL1 (pUCHL/CD8).

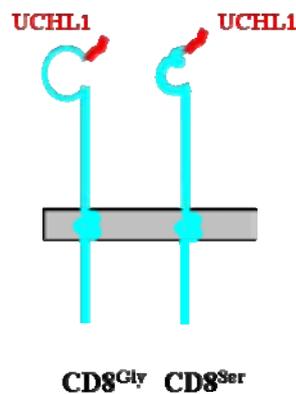


Figura IV.8: Esquema de las variantes nativa y mutante de CD8 α marcadas en su extremo amino con el epítipo UCHL1.

2.1.1 Estudio de la expresión de la glicoproteína CD8 α^{Ser}

2.1.1.1 Experimentos de transfección transitoria

Para estudiar si la glicoproteína CD8 α^{Ser} puede ser transportada hacia la superficie celular y expresarse en la membrana, se realizaron experimentos de transfección con las construcciones UCHL-CD8. Los plásmidos pUCHL/CD8^{Gly} y

RESULTADOS

pUHL/CD8^{Ser} fueron transfectados de forma transitoria en la línea celular COS-7. A las 48 horas se analizó su expresión mediante marcaje en superficie con el anticuerpo monoclonal T8, dirigido contra el dominio Ig de CD8 α y con UCHL1, dirigido contra el péptido derivado de CD45RO. Los resultados se muestran en la Figura IV.9.

La molécula nativa CD8^{Gly}, como era de esperar, puede detectarse con ambos anticuerpos, T8 y UCHL1. La molécula mutante CD8^{Ser} no se detecta con T8, pero sí con UCHL1. Esto demuestra que a pesar de que el dominio inmunoglobulina de la glicoproteína mutante CD8^{Ser} ha perdido su conformación y no puede ser reconocido por los anticuerpos anti-CD8 (todos ellos dependientes de una estructura conservada del dominio *IgV-like*), la molécula puede alcanzar la superficie y expresarse en la membrana celular.

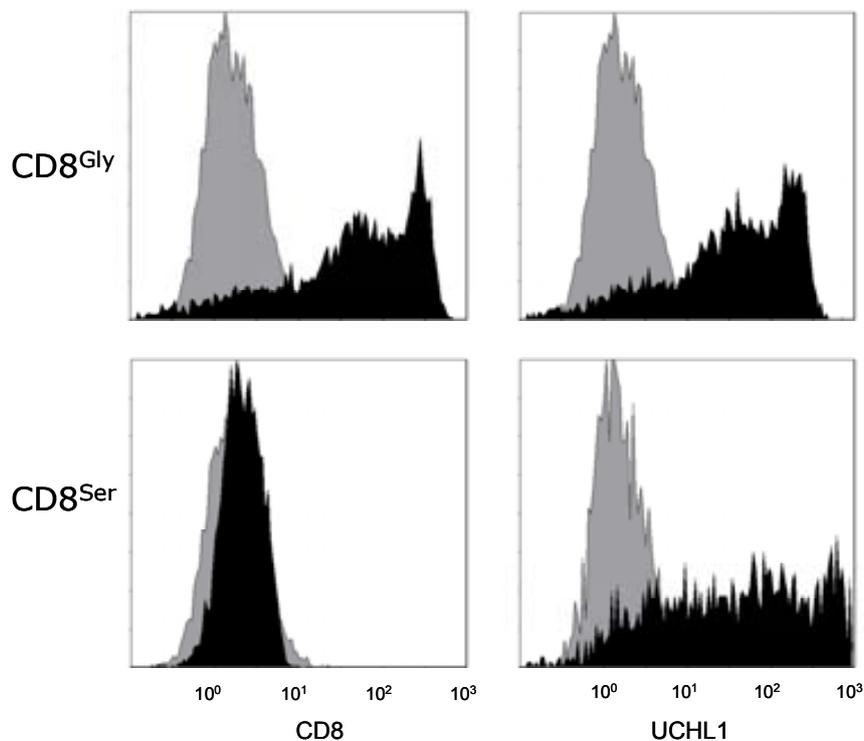


Figura IV.9: Transfección transitoria de la molécula quimérica UHL-CD8 α en la línea celular COS-7 y análisis de la expresión en la superficie celular mediante anticuerpos dirigidos contra el dominio inmunoglobulina de CD8 α y contra el péptido marcador UHL1. Los controles negativos (histogramas grises) se realizaron con células COS-7 transfectadas con un plásmido irrelevante marcadas con el anticuerpo correspondiente en cada caso.

2.1.1.2 Experimentos de transfección estable

Hemos visto que CD8 α ^{Ser} se detecta en la superficie celular a las 48 horas después de su transfección. Para analizar la expresión en un período de tiempo más prolongado y en condiciones más cercanas a las fisiológicas, se realizaron

transfecciones estables de la molécula $CD8\alpha^{Ser}$. Se utilizaron las construcciones $\beta act/UCHLCD8\alpha^{Gly}$ y $\beta act/UCHLCD8\alpha^{Ser}$, que se obtuvieron por subclonaje a partir de $pUCHL/CD8\alpha$. El plásmido βact posee resistencia a geneticina, lo cual permite, con el uso del antibiótico, seleccionar positivamente las clonas que han integrado el plásmido en su genoma. Las transfecciones se realizaron en el hibridoma T murino 9.4BwCw y en la línea murina B 300.19. Los niveles de expresión de la molécula mutante $CD8\alpha^{Ser}$ son algo inferiores a los de la molécula nativa (Figura IV.10). A medida que transcurre el tiempo se observa un aumento del número de células negativas y una disminución de la intensidad de fluorescencia de las células positivas. Esto sucede en la mayoría de las clonas provenientes tanto de las transfecciones 9.4/ $CD8\alpha^{Ser}$ como de las 300.19/ $CD8\alpha^{Ser}$. En la Figura IV.10 vemos los resultados de la transfección en la línea 300.19 donde se analiza la expresión de la molécula mutante a los 15 días (histograma rosa) y a los 30 días (histograma verde) de la transfección. En azul se representa la expresión de la molécula nativa, obteniéndose idénticos resultados a los 15 y a los 30 días.

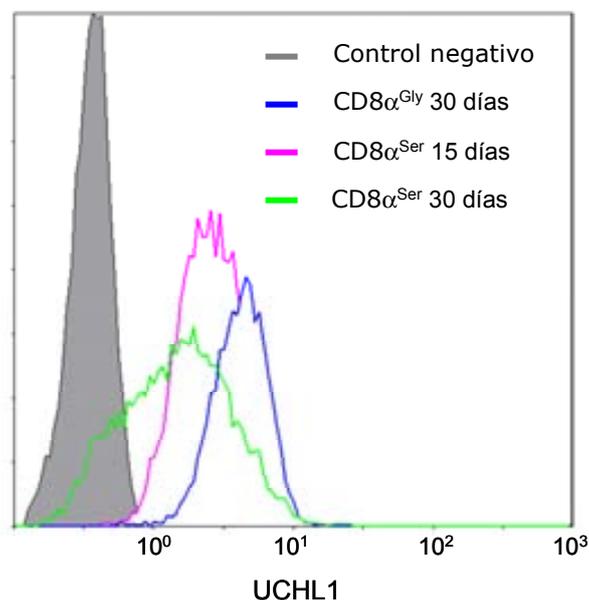


Figura IV.10: Transfección estable de las moléculas quiméricas $UCHL-CD8\alpha^{Gly}$ y $UCHL-CD8\alpha^{Ser}$ en la línea celular 300.19 y análisis de la expresión en la superficie celular mediante tinción con el anticuerpo dirigido contra el péptido marcador UCHL1. El control negativo (histograma gris) corresponde a las células 300.19 sin transfectar marcadas con UCHL1 en idénticas condiciones.

2.1.2 Generación de la mutación Gly>Ser en la molécula CD8 α murina (Lyt-2)

Para analizar con mayor profundidad el impacto de la mutación Gly>Ser, se clonó la región codificante de la molécula CD8 α de ratón en el vector pcDNA3.1 y se realizó la mutagénesis dirigida Gly>Ser en la posición 109, equivalente a la posición 111 de la molécula CD8 α humana. Posteriormente se siguió un procedimiento análogo al que se utilizó para la molécula CD8 α humana para unir el péptido marcador UCHL al extremo amino terminal de Lyt-2 (tanto de la variante nativa como de la mutante), obteniéndose las construcciones pUCHL/Lyt-2^{Gly} y pUCHL/Lyt-2^{Ser}, utilizadas en los experimentos de transfección transitoria. Por último se realizó un subclonaje de las moléculas quiméricas UCHL-Lyt-2^{Gly} y UCHL-Lyt-2^{Ser} al vector de expresión pXSneo, con el fin de poder realizar las transfecciones estables en la línea celular murina 9.4BwCw.

2.1.2.1 Análisis de la expresión de Lyt-2^{Ser} en la superficie celular

Los resultados de los experimentos de transfección fueron similares a los que se obtuvieron para la molécula CD8 α ^{Ser} humana. No se detectó la molécula mutante Lyt-2^{Ser} con ninguno de los anticuerpos dirigidos contra el dominio inmunoglobulina, pero sí con el anticuerpo UCHL-1, dirigido contra el péptido marcador. Asimismo, se observó una disminución de los niveles de expresión de Lyt-2^{Ser} con el tiempo (Figura IV.11), indicando que tal como sucede con la molécula CD8 α ^{Ser} humana, la mutación Gly>Ser afecta la estabilidad de la molécula Lyt-2 en la membrana celular.

Se ha descrito que la acumulación de proteínas con una conformación anómala dentro del retículo endoplásmico (RE) se traduce en una respuesta desde el RE hacia el núcleo celular denominada UPR (*unfolded protein response*) (Ron 2007), que básicamente consiste en aumentar los niveles de proteínas chaperonas y la eficiencia de la maquinaria de degradación asociada al RE (ERAD) (Li 2000, Sheuner 2001). El aumento de la actividad ERAD permitiría explicar la disminución de la expresión de la molécula mutante con una conformación anómala en la membrana a medida que transcurre el tiempo.

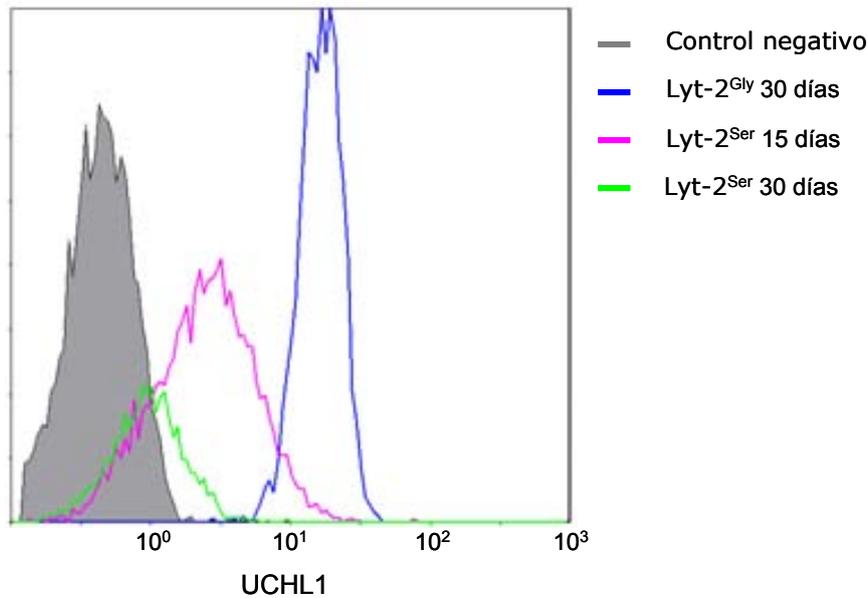


Figura IV.11: Transfección estable de la molécula quimérica UCHL-Lyt-2 en el hibridoma murino 9.4BwCw y análisis de la expresión en la superficie celular mediante tinción con el anticuerpo dirigido contra el péptido marcador UCHL-1. El control negativo (histograma gris) corresponde a las células 9.4 sin transfectar marcadas con UCHL-1 en idénticas condiciones.

2.1.3 Análisis bioquímico de las construcciones UCHL-CD8 α

Los experimentos anteriores demuestran que la mutación afecta en gran medida la conformación del dominio inmunoglobulina (detección de la molécula con anticuerpos dirigidos contra el *tag* pero ausencia de detección con anticuerpos dirigidos contra el dominio *IgV-like*), y sugieren una alteración subsecuente de la biogénesis de la proteína mutante (menor expresión e inestabilidad en la membrana celular).

Para investigar esta posibilidad y dilucidar el mecanismo por el cual la mutación puntual ejerce un impacto tan fuerte en la expresión de la glicoproteína, se realizaron estudios bioquímicos de CD8 α ^{Ser}. En un primer lugar se realizaron estudios de western blot (WB) con extractos de células transfectadas con UCHL-CD8 α . Se seleccionaron las clonas provenientes de las transfecciones estables 300.19/UCHL-CD8^{Gly} y 300.19/UCHL-CD8^{Ser} que expresaban niveles similares de CD8 α , determinados mediante el marcaje con el anticuerpo UCHL-1, y se realizaron los extractos celulares. Se analizó el WB con dos anticuerpos, UCHL-1, dirigido contra el péptido marcador, y 144-B, dirigido contra la cola citoplasmática de CD8 α (Figura IV.12).

RESULTADOS

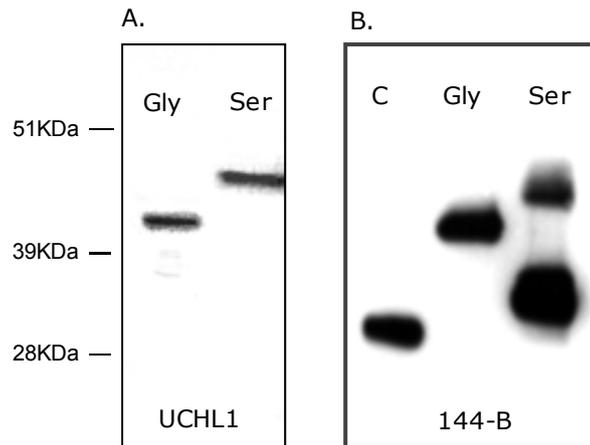


Figura IV.12: A: Análisis por WB con el anticuerpo UCHL-1 de la molécula quimérica UCHL-CD8 α nativa (Gly, primer carril) y mutante (Ser, segundo carril). B: Análisis por WB con el anticuerpo 144-B de la molécula CD8 α de un individuo control (C, primer carril), y de las moléculas quiméricas UCHL-CD8 α : nativa (Gly, segundo carril) y mutante (Ser, tercer carril).

El análisis con el anticuerpo UCHL-1 se muestra en la Figura IV.12 A. En los extractos de UCHL-CD8 α^{Gly} (primer carril) se observa una banda de aproximadamente 44 KDa que concuerda con el peso molecular de CD8 α más el agregado del epítipo UCHL-1, de unos 12 KDa. En los extractos de UCHL-CD8 α^{Ser} (segundo carril) se observa una banda de mayor peso molecular (algo inferior a 50 KDa). La diferencia entre ambas, de aproximadamente 5 KDa, es difícilmente justificable por un cambio de aminoácido de glicina a serina.

En la Figura IV.12 B se muestra el análisis del WB con el anticuerpo 144-B. En el primer carril se observa la banda correspondiente a CD8 α nativa, de 32 KDa. En el extracto de UCHL-CD8 α^{Gly} se observa una banda de 44KDa (tal como ocurre con el anticuerpo UCHL-1), y en el caso de UCHL-CD8 α^{Ser} , sin embargo, se observan dos bandas. La banda de mayor peso molecular coincide con la banda que se obtiene con UCHL-1, mientras que la banda de menor peso molecular (pero de mayor intensidad) solo se observa con el anticuerpo dirigido contra la región citoplasmática.

2.2 Diseño de nuevas construcciones: CD8-V5

El estudio bioquímico de la molécula mutante CD8 α^{Ser} con la construcción UCHL-CD8 α resultaba difícil de interpretar. Por una parte, debido a la diferencia en el peso molecular entre la molécula nativa y la molécula mutante y, por otra parte,

debido a la inconsistencia en el resultado que se obtiene con dos anticuerpos diferentes en el caso de la molécula mutante.

Para intentar esclarecer la interpretación bioquímica, se realizaron nuevas construcciones de CD8 α . Las variantes de CD8 α fueron clonadas en el vector pcDNA3.1/V5-D (Invitrogen) manteniendo el marco de lectura de forma que el péptido V5 queda expresado en el extremo carboxi-terminal (intracelular) de CD8 α (Figura IV.13).

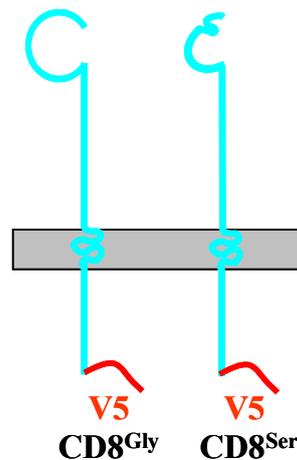


Figura IV.13: Esquema de las variantes nativa y mutante de CD8 α marcadas en su extremo carboxilo con el epítipo V5.

2.2.1 Estudio bioquímico de la molécula CD8 α V5

Las construcciones pcDNA3.1/CD8/V5, fueron transfectadas de forma estable en la línea celular 300.19. Las clonas 300.19/CD8^{Ser}V5 que expresaban niveles de CD8 comparables a las clonas 300.19/CD8^{Gly}V5 (según marcaje intracelular con el anticuerpo V5 por citometría de flujo) se seleccionaron para realizar los extractos proteicos. En la Figura IV.14 se muestra el resultado del western blot con el anticuerpo V5.

El epítipo V5 añade un peso molecular de unos 5 KDa. En el extracto de CD8 α ^{Gly}V5 se observa una banda de aproximadamente 38 KDa, que corresponde al peso molecular de CD8 junto con V5, y además se observa una banda inferior de unos 32 KDa. En el caso de la molécula CD8 α ^{Ser}V5 también se observan dos bandas, cada una de ellas de un peso molecular 5 KDa mayor que las bandas correspondientes a CD8 α ^{Gly}V5. Nuevamente la banda inferior es más intensa que la superior.

RESULTADOS

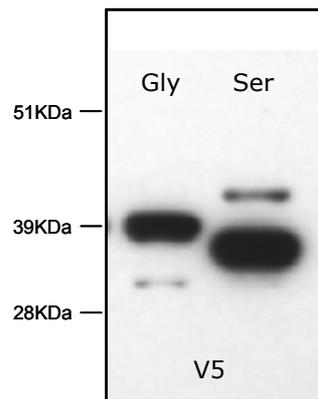


Figura IV.14: Análisis de las moléculas quiméricas CD8 α -V5 nativa (Gly, primer carril) y mutante (Ser, segundo carril) por western-blot con el anticuerpo V5.

A pesar de la variabilidad que se observa según el tipo de construcción o el anticuerpo que se utilice en los WB, siempre se observa en CD8 α ^{Ser} una banda unos 5 KDa mayor que en CD8 α ^{Gly}. Esta diferencia de peso molecular nos llevó a considerar la posibilidad de que el cambio de Gly a Ser se acompañe de un cambio post-traducciona. Analizando el contexto en el que se encuentra la mutación se observa la aparición de una posible diana de N-glicosilación. La secuencia consenso es Asn-X-Ser/Thr-X (N-X-S/T-X), donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, de forma que el cambio de Gly a Ser introduciría la diana (**Asn-Glu-Gly-Tyr** \rightarrow **Asn-Glu-Ser-Tyr**). Para confirmar que el aumento de peso molecular se relaciona con la adición de un oligosacárido se empleó la estrategia que se describe a continuación.

2.2.2 Estudio de la presencia del N-carbohidrato: Digestión con endoglicosidasas

Las endoglicosidasas son enzimas que eliminan los carbohidratos unidos a asparagina. Para corroborar que efectivamente se añade un carbohidrato como consecuencia de la secuencia consenso de N-glicosilación que introduce la mutación, se sometió una parte de los extractos (300.19/CD8V5) a digestión con endoglicosilasas (PNGase-F). En la Figura IV.15 se muestra el resultado del wester blot con el anticuerpo V5 tras digestión con PNGase-F. En los extractos sin digerir (a y b) se observa el mismo patrón que en el experimento anterior (Figura IV.14): dos bandas en el extracto de CD8 α ^{Gly}V5 y dos bandas en el extracto de CD8 α ^{Ser}V5, cada una de ellas 5 KDa superior.

Cuando los extractos son sometidos a digestión con PNGaseF (c y d), las bandas de $CD8\alpha^{Ser}V5$ (d) recuperan el peso molecular de la molécula nativa $CD8\alpha^{Gly}V5$ (a y c), aunque con intensidades relativas opuestas. Este experimento demuestra que el aumento del peso molecular de la molécula mutante $CD8\alpha^{Ser}$ se debe al agregado de un carbohidrato, probablemente unido a la asparagina 109.

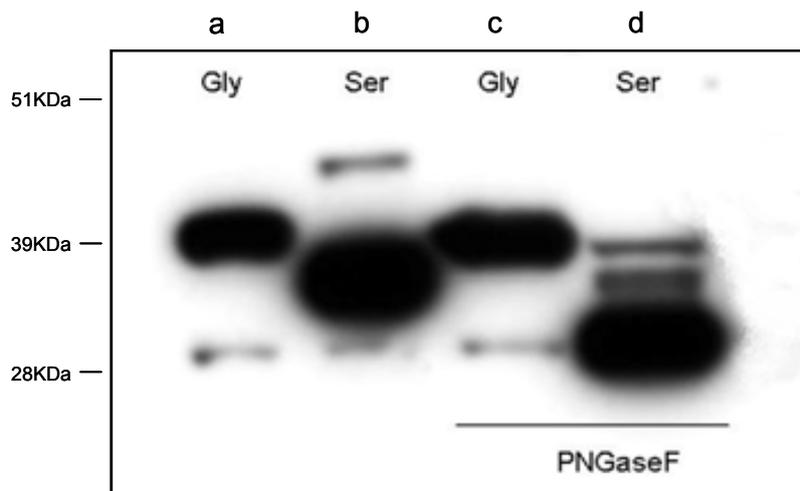


Figura IV.15: Análisis de las moléculas quiméricas $CD8\alpha^{Gly}$ -V5 y $CD8\alpha^{Ser}$ -V5 en extractos sin digerir (a, b), y digeridos con PNGaseF (c, d) por western-blot con el anticuerpo V5. Se realizó una sobreexposición para permitir observar las bandas minoritarias.

Existen varios ejemplos de mutaciones puntuales que introducen dianas de N-glicosilación, y en varios de ellos la causa de la pérdida de la función proteica es el agregado del carbohidrato (GGD o “*gain of glycosylation diseases*”) y no la sustitución del aminoácido (Vogt 2005).

2.2.3 Eliminación de la diana de N-glicosilación y análisis de la conformación del dominio Ig

La eliminación del N-carbohidrato podría conducir a la recuperación de la conformación del dominio inmunoglobulina. Para evaluar esta posibilidad, era necesario eliminar la N-glicosilación en la glicoproteína mutante $CD8\alpha^{Ser}$. Una estrategia es eliminar la diana de N-glicosilación mediante mutagénesis dirigida, pero manteniendo la mutación original Gly>Ser. Puesto que la secuencia consenso es **N-X-S/T-X**, su interrupción puede conseguirse cambiando la asparagina (N) por otro aminoácido. En muchas especies la molécula $CD8\alpha$ tiene conservada la secuencia

RESULTADOS

D-E-G-Y-Y-F-C. Por otra parte la glicoproteína CD7 humana, que presenta una elevada homología a CD8 α , también tiene un residuo de ácido aspártico en lugar de asparagina (**D-T-G-T-Y-T-C** en CD7, **N-E-G-Y-Y-F-C** en CD8 α). Por lo tanto, decidimos mutar la asparagina (N) a aspártico (D), ya que era más probable que la sustitución por este aminoácido no produjese una alteración importante en la estructura de la proteína CD8 α ^{Ser}. Para corroborar este punto, se realizó también el cambio de asparagina a aspártico en la molécula nativa CD8 α ^{Gly}. La mutagénesis dirigida AAC (N, Asn) > GAC (D, Asp) se realizó en las construcciones pUHL/CD8 α (Gly y Ser), aptas para realizar transfecciones transitorias. En la Figura IV.16 se observa la secuencia de pUHL/CD8 α ^{Gly} y pUHL/CD8 α ^{Ser} una vez introducida la mutación Asn>Asp.

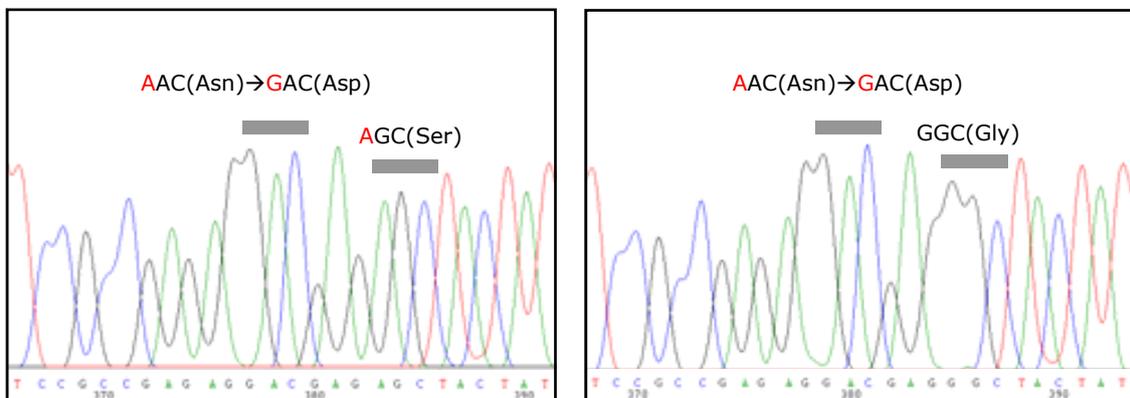


Figura IV.16: Análisis por secuenciación del resultado de la mutagénesis dirigida Asn→Asp en las construcciones pUHL/CD8 α ^{Ser} (Izquierda) y pUHL/CD8 α ^{Gly} (Derecha).

Con las construcciones pUHL1/CD8 α ^{Ser}, pUHL1/CD8 α ^{Ser-Asp}, pUHL1/CD8 α ^{Gly} y pUHL1/CD8 α ^{Gly-Asp}, se realizaron transfecciones transitorias en la línea celular COS7. A las 48 horas se determinó la expresión por citometría de flujo de las variantes CD8 α mediante tinción con un anticuerpo dirigido contra el dominio inmunoglobulina de CD8. De esta forma, el reconocimiento de la molécula depende de que exista una conformación correcta de dicho dominio.

Como puede observarse, la molécula CD8 α ^{Gly-Asp}, nativa respecto de la mutación original pero con aspártico en lugar de asparagina, se expresa perfectamente (Figura IV.17 B), demostrando que el cambio de este aminoácido no es imprescindible para la correcta conformación del dominio inmunoglobulina. Por otra parte, no se detecta expresión de CD8 α ^{Ser-Asp} (Figura IV.17 D) mediante anticuerpos dirigidos contra

el dominio inmunoglobulina de $CD8\alpha$, del mismo modo que sucede con el mutante original $CD8\alpha^{Ser}$ (Figura IV.17 C).

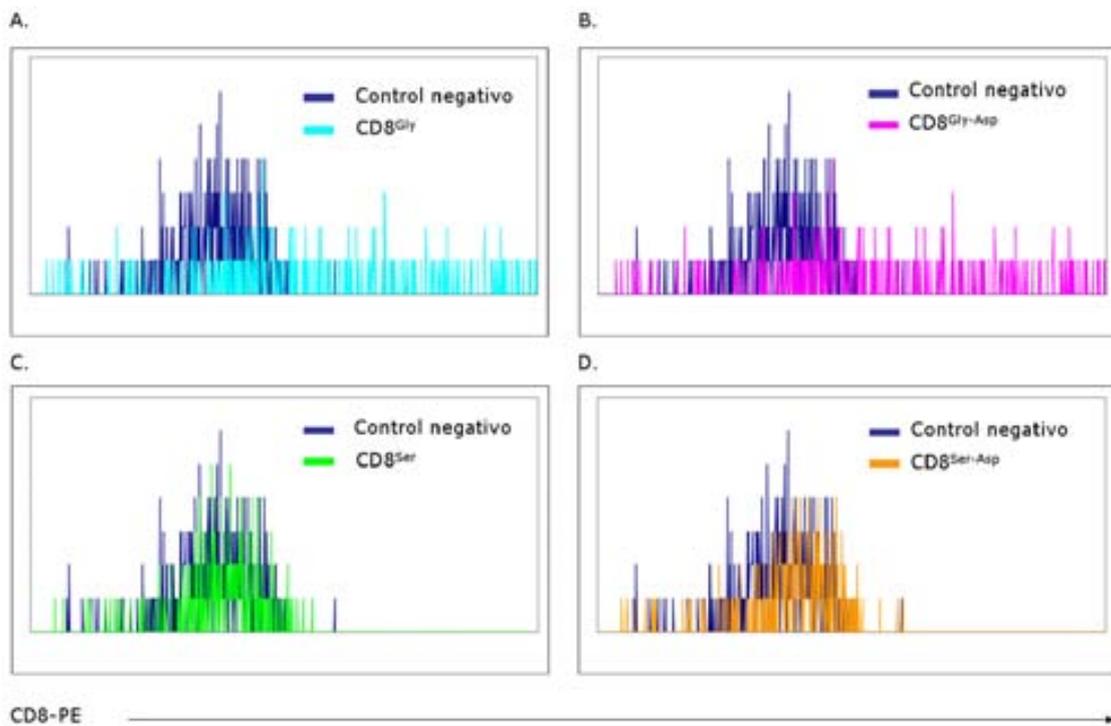


Figura IV.17: Transfección transitoria de las moléculas $CD8\alpha^{Gly}$ (A), $CD8\alpha^{Gly-Asp}$ (B), $CD8\alpha^{Ser}$ (C) y $CD8\alpha^{Ser-Asp}$ (D) en la línea celular COS-7 y análisis de la expresión en la superficie celular mediante un anticuerpo dirigido contra el dominio inmunoglobulina de $CD8\alpha$. Los controles negativos (histogramas azules) corresponden a células COS-7 transfectadas con un plásmido irrelevante marcadas con el mismo anticuerpo.

Esto indica que el hecho de eliminar el sitio de N-glicosilación no restaura la estructura en $CD8\alpha^{Ser}$, por lo que es probable que la causa de la alteración del dominio inmunoglobulina se deba fundamentalmente al cambio de glicina por serina. De esta forma, el agregado del N-carbohidrato sería responsable del aumento del peso molecular que se observa en $CD8\alpha^{Ser}$, pero no de la alteración estructural de la molécula.

2.2.4 Análisis de la O-glicosilación en $CD8\alpha^{Ser}$

Analizando detalladamente el estudio bioquímico de las construcciones $CD8\alpha^{V5}$ (Figura IV.14), puede observarse que tanto en la molécula nativa $CD8\alpha^{GlyV5}$ como en la molécula mutante $CD8\alpha^{SerV5}$ aparecen dos bandas. Hemos visto que el mayor peso molecular en las bandas de $CD8\alpha^{SerV5}$ se debe al agregado del N-carbohidrato. Otro hecho que llama la atención es que en la molécula nativa

RESULTADOS

predomina la banda superior, mientras que en la molécula mutante es mucho más intensa la banda inferior. La molécula CD8 α es una glicoproteína con una regulación compleja en el grado de O-glicosilación de la región extendida o *stalk region* (Pascale 1992). En la molécula CD8 $\alpha^{\text{Gly-V5}}$, la banda mayoritaria de 38 KDa corresponde a la forma madura O-glicosilada de CD8 más el agregado del epítipo V5, y la otra banda débil de aproximadamente 32 KDa corresponde a formas inmaduras de la molécula CD8 α sin glicosilar. Por el contrario, en el caso de la molécula CD8 α^{Ser} la forma predominante es la de menor peso molecular, es decir, la forma inmadura. Una consecuencia lógica de esta observación es que la mutación afecta al proceso de O-glicosilación, indicando que CD8 α^{Ser} no llega correctamente al aparato de Golgi.

2.2.5 Análisis de la diferencia en el patrón de O-glicosilación que se observa usando diferentes anticuerpos y/o diferentes construcciones

2.2.5.1 Análisis de UCHL-CD8 α^{Ser} con diferentes anticuerpos

En los experimentos de WB con el anticuerpo UCHL-1 (Figura IV.12 A) se observa, en el extracto de UCHL-CD8 α^{Ser} , una banda de mayor peso molecular que en la molécula nativa, UCHL-CD8 α^{Gly} . Considerando que la banda que predomina en la molécula nativa es la forma O-glicosilada, se deduce que en UCHL-CD8 α^{Ser} estamos detectando la forma completamente glicosilada (O- y N-glicosilada). Sin embargo en el análisis de UCHL-CD8 α^{Ser} con el anticuerpo 144-B (Figura IV.12 B) se observan dos bandas, correspondientes tanto a la forma inmadura (no O-glicosilada) como a la forma madura O-glicosilada, las cuales están N-glicosiladas.

El hecho de que con el anticuerpo UCHL-1 solo se observe la forma madura O-glicosilada de CD8 α^{Ser} (Figura IV.12 A), se debe a que los motivos de carbohidratos unidos a residuos de serina y treonina contribuyen a formar el epítipo que reconoce el anticuerpo, derivado de la molécula humana CD45RO (Pulido 1989). Analizando la secuencia del epítipo se observan una gran cantidad de sitios potenciales de O-glicosilación (serinas, S, y threoninas, T), resaltados en negrita en el recuadro:

ATG	ACC	ATG	TAT	TTG	TGG	CTT	AAA	CTC	TTG	GCA	TTT	GGC	TTT	GCC
M	T	M	Y	L	W	L	K	L	L	A	F	G	F	A
TTT	CTG	GAC	ACA	GAA	GTA	TTT	GTG	ACA	GGG	CAA	AGC	CCA	ACA	CCT
F	L	D	T	E	V	F	V	T	G	Q	S	P	T	P
TCC	CCC	ACT	GAT	GCC	TAC	CTT	AAT	GCC	TCT	GAA	ACA	ACC	ACT	CTG
S	P	T	D	A	Y	L	N	A	S	E	T	T	T	L
AGC	CCG	GGT	CGA	CTC	GAG	TCT	AGA	TAG						
S	P	G	R	L	E	S	R	*						

De esta forma, solamente aquella fracción de la quimera UCHL-CD8 α^{Ser} que haya sufrido un correcto proceso de O-glicosilación en el Golgi (tanto en CD8 como en UCHL) podrá ser reconocida por el anticuerpo. En cambio, el epítipo que reconoce el anticuerpo 144-B no depende de la O-glicosilación, por lo que en el extracto de UCHL-CD8 α^{Ser} se observan tanto la forma inmadura como la forma madura O-glicosilada (Figura IV.12).

2.2.5.2 Análisis de CD8 α^{Ser} unida a distintos péptidos marcadores

Analizando nuevamente la imagen del WB de UCHL-CD8 α^{Ser} con el anticuerpo 144-B (Figura IV.12 B), y comparándola con la imagen que se obtiene para CD8 α^{Ser} V5 detectada con el anticuerpo V5 (Figura IV.14), puede observarse que en las construcciones CD8 α^{Ser} V5 la forma inmadura de CD8 α^{Ser} es notablemente más abundante. Lo mismo sucede si analizamos la molécula nativa CD8 α^{Gly} . En CD8 α^{Gly} V5 se observa, aunque en pequeña cantidad, la forma inmadura sin O-glicosilación, mientras que en la construcción UCHL-CD8 α^{Gly} , al igual que sucede con CD8 α sin péptido marcador (extracto de leucocitos de un individuo control), solo se detecta la forma madura O-glicosilada.

Una posible explicación surge de la extrapolación de resultados de otros estudios sobre el tránsito intracelular de CD8 α , en los cuales se describe que la valina carboxi-terminal de CD8 α es una señal de salida del RE (Iodice 2001). Probablemente el epítipo V5 unido a la cola citoplasmática de CD8 elimina dicha valina terminal, subvirtiendo la señal de exportación. De esta forma la eficiencia del transporte desde el RE hacia el Golgi y, como consecuencia, del proceso de O-glicosilación, se vería afectada.

2.2.5.3 Análisis del patrón de O-glicosilación tras la eliminación de la diana de N-glicosilación

La N-glicosilación que se produce como consecuencia del cambio de glicina a serina en la proteína CD8 α mutante podría afectar el tránsito a través del RE y el consiguiente proceso de O-glicosilación en el aparato de Golgi. Si esto es cierto, la eliminación de la diana de N-glicosilación en las construcciones CD8 α V5 debería conllevar una recuperación de la forma madura O-glicosilada de CD8 α ^{Ser}. Para evitar la presencia del carbohidrato en la asparagina 109, se diseñaron dos estrategias. La primera consiste en inhibir los primeros pasos del proceso de N-glicosilación. La tunicamicina es un antibiótico que inhibe una glucosil transferasa responsable de la formación de Dol-P-P-NAcGln, pero también ejerce efectos tóxicos para la célula. Las células 300.19 transfectadas con las variantes nativa y mutante de CD8 α V5 se cultivaron en presencia de tunicamicina durante 48 horas antes de preparar los extractos celulares correspondientes. Se utilizaron dosis en las que se observa una limitada mortalidad celular (20 ng/mL), y dosis más altas (40 ng/mL), en las que se observa una mortalidad superior al 50%. En el último caso, antes de realizar el pellet celular, se realizó un paso de purificación de células vivas mediante gradiente de ficoll.

La segunda forma de evitar que se produzca la N-glicosilación consiste en la eliminación de la secuencia consenso de N-glicosilación mediante mutagénesis dirigida. Se siguió una metodología análoga a la realizada para las construcciones pUHL-CD8 α (explicada en el apartado 2.2.3), pero realizando el cambio AAC (N, Asn) \rightarrow GAC (D, Asp) en los plásmidos pcDNA3.1/CD8 α ^{Ser}-V5 y pcDNA3.1/CD8 α ^{Gly}-V5. Estas construcciones nos permiten, por una parte, realizar transfecciones estables mediante selección con genética y, por otra parte realizar los experimentos de WB con el anticuerpo V5. Los plásmidos pcDNA3.1/CD8 α ^{Ser-Asp}V5 y pcDNA3.1/CD8 α ^{Gly-Asp}V5 se transfectaron de forma estable en el hibridoma T murino 9.4 y se realizaron extractos celulares con aquellas clonas CD8 α ^{Ser}V5-Asp, que expresaban niveles de CD8 comparables (según la tinción con V5) a los de CD8 α ^{Gly}V5-Asp.

En la Figura IV.18 A se muestran los resultados de WB de los extractos de células tratadas con tunicamicina. En el primer carril se observan las dos formas de la molécula nativa, predominando la forma madura O-glicosilada. En la molécula mutante sin tratamiento con tunicamicina (segundo carril) se observa la forma

N-glicosilada sin O-glicosilación. El tratamiento con tunicamicina a una dosis de 20 ng/mL produce una inhibición parcial de la N-glicosilación en la molécula mutante, como puede observarse en el carril 3. En el carril 4 se observa solo la forma sin glicosilar, indicando que a una dosis de 40 ng/mL la tunicamicina produce una inhibición total de la N-glicosilación.

En la Figura IV.18 B se observan los resultados del WB de los extractos de las células transfectadas con las construcciones donde se eliminó la diana de N-glicosilación mediante mutagénesis dirigida N>D. En la molécula mutante aparece la banda correspondiente a la forma sin glicosilar, como era de esperar tras la eliminación de la diana de N-glicosilación.

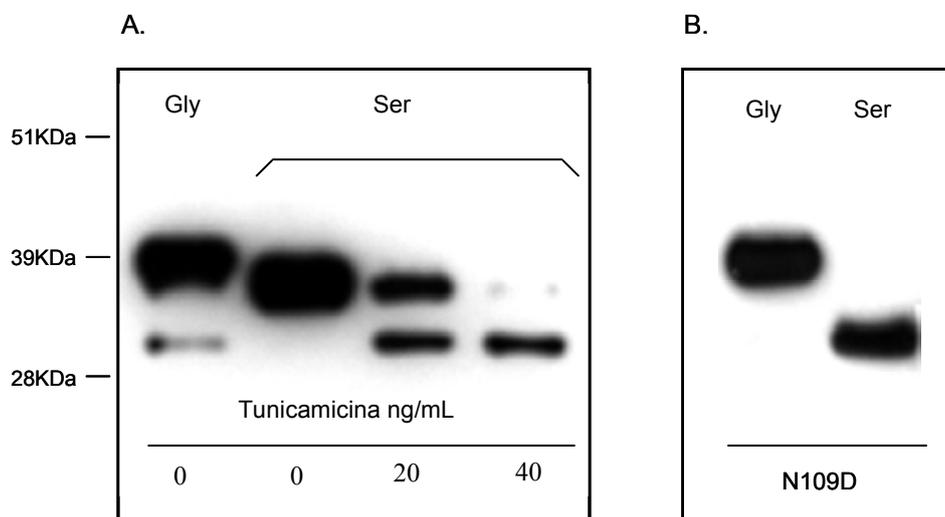


Figura IV.18: Análisis por western-blot de las moléculas quiméricas CD8 α -V5^{Gly} y CD8 α -V5^{Ser} tras la inhibición de la N-glicosilación con tunicamicina (A) o la eliminación de la diana de N-glicosilación (B).

En conclusión, la eliminación de la N-glicosilación, ya sea inhibiendo el enzima glucosil transferasa (tratamiento con tunicamicina, Figura IV.18 A) o eliminando la propia diana (mutagénesis dirigida, N>D, Figura IV.18 B), no conlleva en absoluto la recuperación de la forma madura O-glicosilada en CD8 α ^{Ser}, que, sin embargo, es la forma predominante en la molécula nativa, CD8 α ^{Gly}. Por lo tanto, la pérdida de la conformación del dominio inmunoglobulina y la alteración subsiguiente del proceso de O-glicosilación en el Golgi, están causadas por el cambio Gly>Ser, y no por la adición del N-carbohidrato en dicho dominio inmunoglobulina de CD8 α ^{Ser}.

2.2.6 Análisis de la capacidad de dimerización de CD8^{Ser}

La falta de O-glicosilación de CD8 α^{Ser} indicaría un defecto en el transporte de la proteína desde el retículo endoplásmico (RE) hacia el Golgi. Un requisito previo para que las proteínas de secreción o de membrana puedan superar el control de calidad del RE, es que tengan un plegamiento correcto (forma terciaria) y que se encuentren formando dímeros (forma cuaternaria) si, como en el caso de CD8, esta es su conformación normal. Si la capacidad de homo/heterodimerización se encontrara afectada, esto se traduciría en una ineficiencia en el tránsito desde el RE hacia el aparato de Golgi, y por lo tanto de las modificaciones post-traduccionales que se producen en este.

2.2.6.1 Análisis de la capacidad de homodimerización: Experimentos de western blot en condiciones no reductoras

Para estudiar la capacidad de homodimerización de CD8 α^{Ser} , se realizaron experimentos de WB en condiciones no reductoras. De esta forma se puede analizar la glicoproteína en su estructura cuaternaria. Se realizaron extractos de células 300.19 transfectadas de forma estable con las construcciones UCHL-CD8 α y CD8 α -V5, de las variantes nativa (Gly) y mutante (Ser).

En la Figura IV.19 A se observa un WB en condiciones no reductoras con extractos de células transfectadas con las construcciones UCHL-CD8 α^{Gly} y UCHL-CD8 α^{Ser} . En el primer carril se observa una banda de unos 65 KDa, correspondiente a la forma dimérica de la molécula nativa CD8 $\alpha\beta$ de un individuo control (C). La forma dimérica de la molécula UCHL-CD8 α^{Gly} se observa como una banda de mayor peso molecular, de aproximadamente 80 KDa (segundo carril), debido al agregado del epítipo UCHL-1. Sin embargo, en el caso de la molécula UCHL-CD8 α^{Ser} (tercer carril) la banda correspondiente al dímero (de unos 100 KDa debido al agregado del N-carbohidrato) prácticamente no se observa, sino que aparece una banda de menor tamaño (pero de mayor tamaño que el monómero) y gran parte de la proteína queda retenida en la zona de carga. La práctica ausencia del dímero de la molécula mutante no se debe a una baja cantidad de proteína en el extracto, como puede observarse en el WB en condiciones no reductoras utilizando los mismos extractos pero revelado con anti β -actina (Figura IV.19 B).

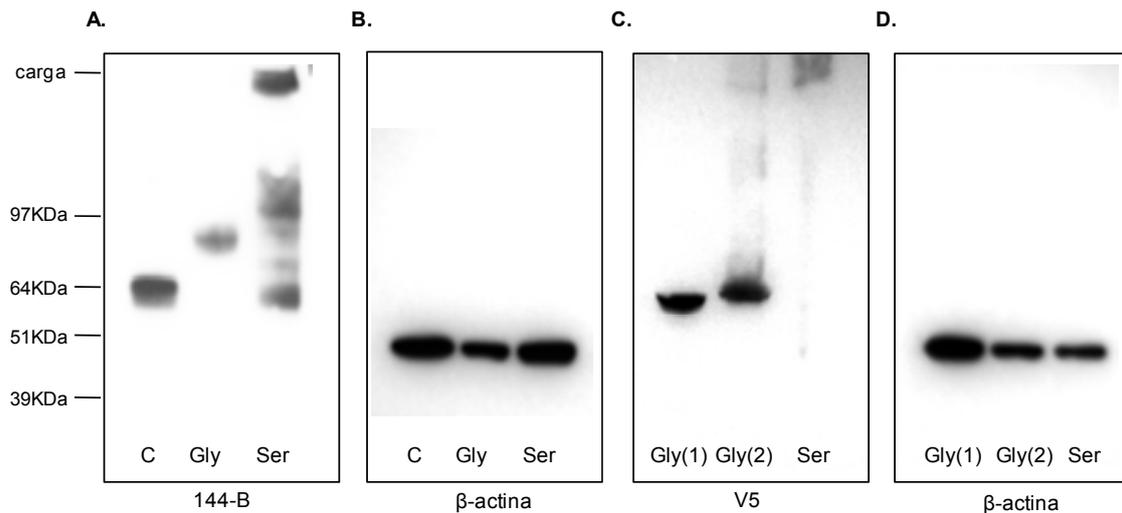


Figura IV.19: WB en condiciones no reductoras. A: Detección con el anticuerpo 144-B de extractos de células de un individuo control ("C", primer carril), de células transfectadas con Uchl-CD8α^{Gly} (Gly, segundo carril), y de células transfectadas con Uchl-CD8α^{Ser} (Ser, tercer carril). B: los mismos extractos detectados con el anticuerpo anti β-actina. C: Detección con el anticuerpo V5 de extractos de dos clones de células transfectadas con CD8α^{Gly}V5 (Gly(1), primer carril y Gly(2) segundo carril) , y de células transfectadas con CD8α^{Ser}V5 (Ser, tercer carril). D: los mismos extractos detectados con el anticuerpo anti β-actina.

En el caso de las construcciones CD8α^{Ser}-V5 (Figura IV.19 C) sucede algo similar, sólo se observa la forma dimérica de la variante nativa, y también se comprueba una cantidad adecuada de proteína en los extractos cuando el WB se realiza con anti β-actina (Figura IV.19 D). Curiosamente tampoco se detecta la forma correspondiente al monómero en los extractos de CD8α^{Ser}-V5 y Uchl-CD8α^{Ser}, probablemente debido a que, al no poder dimerizar, la molécula mutante formaría agregados proteicos insolubles en condiciones no reductoras (estabilizados por puentes disulfuro), que quedarían retenidos en la zona de carga (Carleton 1997).

2.2.6.2 Análisis de la capacidad de CD8α^{Ser} para formar heterodímeros con CD8β: Experimentos de cotransfección

Puesto que la molécula mutante CD8α^{Ser} no forma homodímeros, es probable que también tenga afectada la capacidad de formar heterodímeros con CD8β. Para estudiar esta posibilidad, se realizaron experimentos de cotransfección de CD8β junto a las variantes nativa y mutante de CD8α. Para la expresión de la cadena α se utilizaron las construcciones pcDNA3.1/CD8α^{Gly}-V5 y pcDNA3.1/CD8α^{Ser}-V5. La construcción CD8β se obtuvo clonando la región codificante de la cadena β en el vector de expresión pcDNA3.1. La cotransfección se realizó en la línea celular COS-7

RESULTADOS

utilizando una cantidad 4 veces mayor de CD8 β que de CD8 α , para aumentar la eficiencia en la formación de heterodímeros CD8 $\alpha\beta$.

Como puede observarse en la Figura IV.20 A, CD8 α^{Gly} forma heterodímeros con CD8 β , según muestra la tinción con el anticuerpo anti-CD8 β (2ST8.5H7), que detecta la expresión de las cadenas α y β unidas. Por el contrario, la molécula CD8 α^{Ser} se muestra incapaz de formar heterodímeros con CD8 β (Figura IV.20 B), y por tanto de rescatar su expresión en la superficie celular.

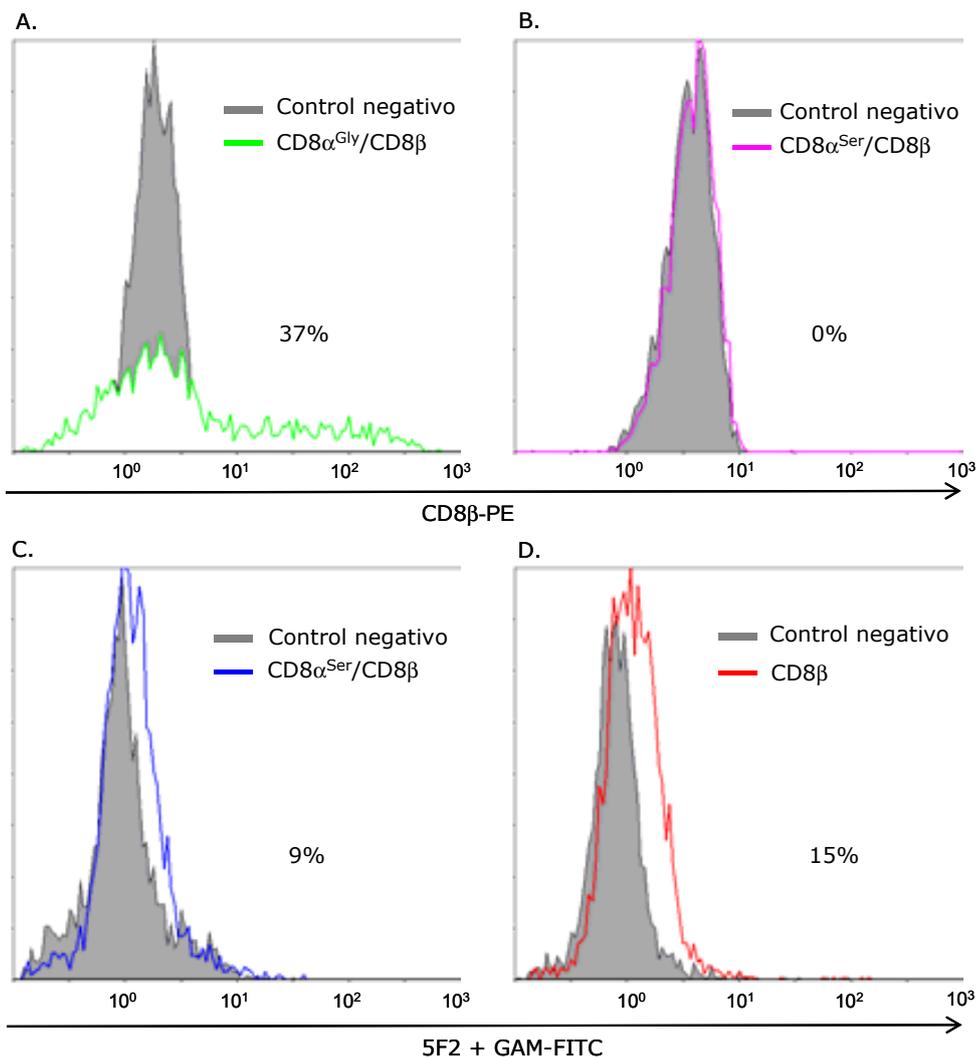


Figura IV.20: Cotransfección de la cadena β junto con la cadena α^{Gly} (A) o α^{Ser} (B, C) del corresponsor CD8. A y B: Detección con el AcMo CD8 β -PE (2ST8.5H7). C y D: Detección con el AcMo 5F2, en el panel D se muestra la transfección aislada de la cadena CD8 β . El control negativo (histograma gris) se realizó marcando las células COS-7 transfectadas con un plasmido irrelevante con los anticuerpos correspondientes en cada caso.

Curiosamente, la cadena β de CD8 puede formar homodímeros, que son capaces de expresarse en bajos niveles en la superficie celular (Devine 2000). Dicho

fenómeno se observa en el resultado de la transfección aislada de CD8 β (Figura IV.20 D), y explicarían los bajos niveles de expresión de CD8 β que se observan en la cotransfección de CD8 α^{Ser} y CD8 β cuando se detecta la expresión con el anticuerpo 5F2, que reconoce CD8 β independientemente de su asociación con CD8 α (Figura IV.20 C).

2.2.7 Análisis del impacto de la mutagénesis Gly>Ser sobre la glicoproteína CD7

La incapacidad de dimerización de la molécula CD8 α^{Ser} podría ser la causa de la incapacidad de detección de CD8 en la membrana celular en los pacientes. Una cuestión importante es, por tanto, investigar que efecto tendría la mutación Gly>Ser en una molécula con un dominio inmunoglobulina tipo V muy similar a CD8 pero que se exprese como monómero. La molécula que cumple estas condiciones es CD7, una glicoproteína con una alta homología a CD8, y que se expresa en la superficie de la mayoría de los linfocitos T. En CD7 la glicina homóloga a CD8 se encuentra en el residuo 109. El cambio Gly>Ser no introduce una diana de N-glicosilación como sucede en CD8 α , ya que la secuencia para CD7 en esta región es: **D-T-G-T-Y-T-C**, mientras que para CD8 es: **N-E-G-Y-Y-F-C**, resultando el cambio Gly>Ser en la secuencia **D-E-S-Y-Y-F-C**, que carece del motivo de N-glicosilación.

Para reproducir la mutación Gly>Ser se clonó la región codificante de CD7 en pCR2.1 y luego se subclonó en el vector de expresión pXSneo. En este vector, se realizó la mutagénesis dirigida Gly (**GGC**) \rightarrow Ser (**AGC**).

También se clonó la región codificante de CD7 directamente en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1, y luego se realizó la mutagénesis dirigida Gly>Ser, para poder comparar la expresión de CD7^{Gly} vs. CD7^{Ser} en dos vectores diferentes.

2.2.7.1 Transfección transitoria

Antes de estudiar la estabilidad de CD7^{Ser} era necesario comprobar que las construcciones funcionasen y que el anticuerpo α -CD7 era capaz de detectar la molécula mutante. Por ello se realizaron en primer lugar una serie de transfecciones transitorias en la línea celular COS7 con las construcciones recién mencionadas.

RESULTADOS

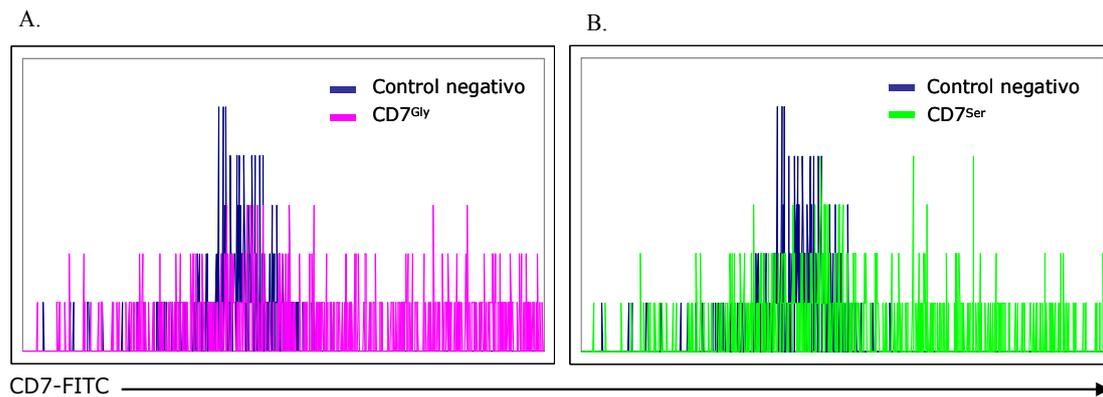


Figura IV.21: Transfección transitoria de la molécula CD7^{Gly} (A) y CD7^{Ser} (B) en la línea celular COS-7 y análisis de la expresión en la superficie celular. Los controles negativos (histogramas azules) se realizaron con células COS-7 transfectadas con un plásmido irrelevante marcadas con el mismo anticuerpo.

La molécula mutante CD7^{Ser} se detecta en la superficie celular en niveles similares a la molécula nativa CD7^{Gly} (Figura IV.21) con un panel de anticuerpos dirigidos contra CD7 (CBC 37.80, 142-9, 186-M).

2.2.7.2 Transfección estable

Para estudiar si el cambio Gly>Ser afecta la estabilidad a medio plazo de la glicoproteína CD7, es decir, si los niveles de expresión en la membrana celular disminuyen con el tiempo, se realizaron transfecciones estables en la línea celular 9.4, con las construcciones pcDNA3.1/CD7^{Gly} y pcDNA3.1/CD7^{Ser}.

Como puede observarse en la Figura IV.22, la molécula mutante CD7^{Ser} se expresa en forma similar a la variante nativa, CD7^{Gly}, incluso en las células mantenidas en cultivo durante más de un mes después de realizada la transfección. El cambio Gly>Ser, por tanto, no parece ejercer ningún efecto negativo en la capacidad de la glicoproteína monomérica CD7 para expresarse de manera estable en la membrana celular. Junto con los experimentos anteriores, este resultado nos lleva a considerar que el fuerte impacto que ejerce la mutación en la biogénesis y la expresión estable de CD8 α en la membrana celular, se debería, fundamentalmente, a que dificulta su capacidad de formar dímeros.

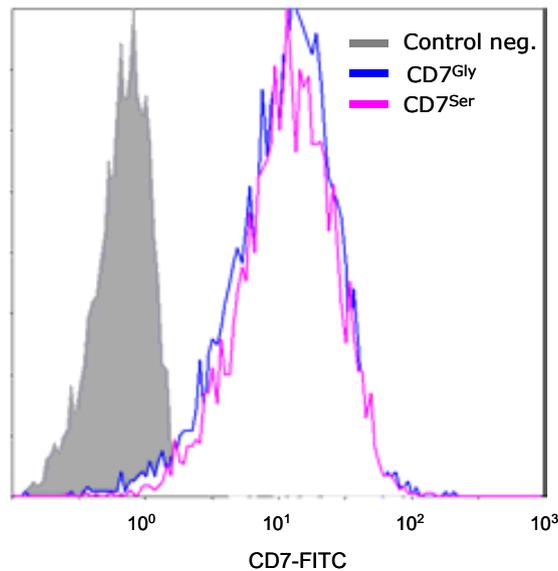


Figura IV.22: Transfección estable de la molécula CD7^{Gly} y CD7^{Ser} en la línea celular 9.4 y análisis de la expresión en la superficie celular. El control negativo (histograma gris) corresponde a las células 9.4 sin transfectar marcadas con el mismo anticuerpo en idénticas condiciones.

De hecho, el residuo afectado por la mutación (Gly111) se encuentra en la región involucrada directamente en la dimerización con la otra cadena de CD8 (sea esta otra cadena CD8 α o la cadena CD8 β), y sería un residuo escasamente permisivo para ningún otro aminoácido que no fuese una Glicina (J. Tormo, comunicación personal). Esta glicina está altamente conservada en proteínas diméricas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y poseen un dominio tipo variable, cerrado por un puente disulfuro. De este modo, el impacto de la serina en esta posición estaría más relacionado con la formación de dímeros entre ambos dominios inmunoglobulina que con la cercanía de este aminoácido a la cisteína que forma el puente disulfuro que cierra el dominio.

2.2.8 Análisis del tránsito intracelular de CD8 α ^{Ser} tras la modificación de los N-carbohidratos

Los N-carbohidratos juegan un papel importante durante las primeras etapas de la vía de secreción, regulando el plegamiento, el control de calidad, y el tránsito intracelular de las glicoproteínas desde el RE hacia el Golgi. En el RE existen una serie de enzimas que modifican residuos de carbohidratos. Las glucosidasas I y II eliminan secuencialmente dos residuos de glucosa convirtiendo la estructura resultante (monoglicosilada) en diana para el ciclo Calnexina-Calreticulina. Las glicoproteínas quedan retenidas en dicho ciclo (que involucra glucosidasas y glucosil transferasas)

RESULTADOS

hasta que adquieren su conformación correcta. Si el plegamiento adecuado no se consigue, la ER-manosidasa I elimina un residuo de manosa generando una estructura que actúa como una señal requerida por ERAD, la maquinaria de degradación asociada al RE (Cabral 2001, Hebert 2005, Helenius 2004). Por lo tanto, la disrupción de alguno de los pasos de modificación de los N-carbohidratos puede interferir con los mecanismos de control de calidad y favorecer la expresión en la superficie celular de glicoproteínas anómalas (Vogt 2008, Bartoli 2008). Para investigar esta hipótesis, se estudió la expresión de CD8^{Ser} en células 300.19 transfectadas con β act/UCHLCD8 α ^{Ser} y cultivadas en presencia de modificadores de la N-glicosilación. Las glicosidasas I y II pueden inhibirse con N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ) (Pan 1983, Elbein 1991), mientras que Kifunensine es un inhibidor potente de la Golgi manosidasa I (Elbein 1990) y ER-manosidasa I (Weng 1993, 1996). Las células fueron tratadas con NB-DNJ a una concentración de 1 mM o con Kifunensine a concentraciones de 1 y 10 μ M durante 48 horas, sin observarse toxicidad en ninguna de las condiciones. A continuación se determinó la expresión de CD8 α ^{Ser} mediante anticuerpos dirigidos contra el *tag* UCHL-1 y contra el dominio *IgV-like* de CD8 α , en este caso para evaluar una posible recuperación de la estructura del dominio inmunoglobulina. Las células expresan mayores niveles de CD8 α ^{Ser} tras el tratamiento con los inhibidores de glicosidasas, observándose el mayor aumento en las células tratadas con Kifunensine a una concentración de 10 μ M, como puede verse en la Figura IV.23 B (NB-DNJ y Kifunensine 1 μ M producen el mismo aumento en la expresión de CD8 α ^{Ser}, pero más moderado que Kifunensine 10 μ M). Los niveles de expresión de CD8 α ^{Gly} no se ven afectados por el tratamiento con Kifunensine ni con NB-DNJ (Figura IV.23 A), como es lógico considerando que la molécula nativa no posee ningún N-oligosacárido.

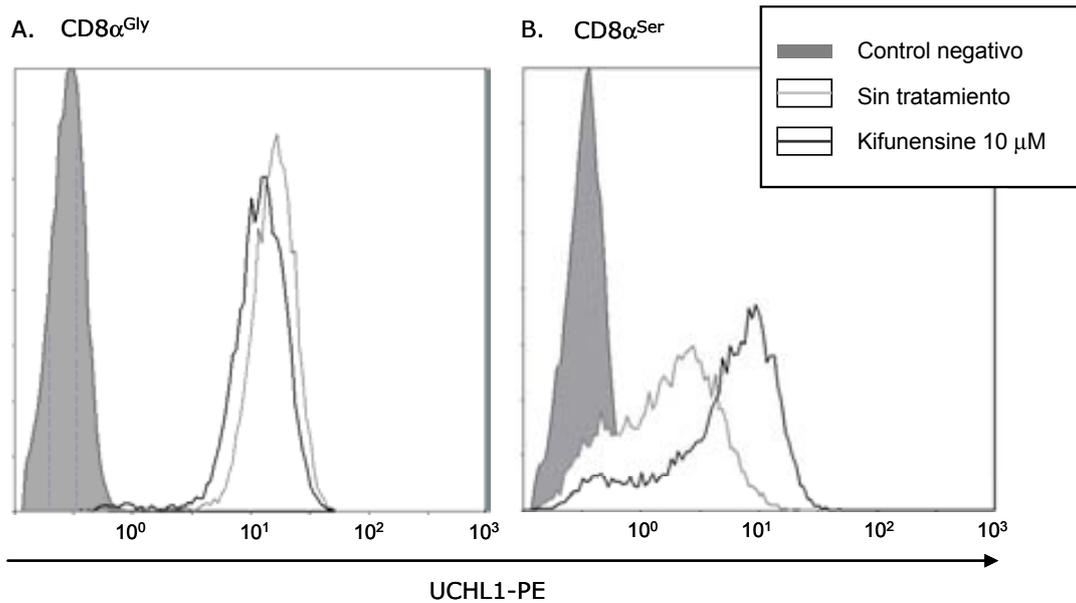


Figura IV.23: Las células 300.19 transfectadas con UCHL-CD8 α^{Gly} (A) y UCHL-CD8 α^{Ser} (B) fueron tratadas con Kifunensine y NB-DNJ. A las 48 horas se determinó la expresión en la superficie celular con el anticuerpo UCHL-1 dirigido contra el tag.

El aumento en la expresión no se relaciona con la recuperación del dominio inmunoglobulina de CD8 α , puesto que con anticuerpos dirigidos contra dicho dominio no se detecta expresión de la molécula mutante después del tratamiento. Por lo tanto, el aumento en la expresión de CD8 α^{Ser} en la superficie celular se debería a una evasión del mecanismo de control de calidad y, por tanto a un aumento del tránsito RE-Golgi de la molécula mutante. Si esto es así, debería registrarse un aumento en el grado de O-glicosilación de la proteína mutante. Para evaluar esta posibilidad, se realizaron estudios de WB con extractos de células transfectadas con la molécula mutante CD8 α^{Ser} sin tratamiento y tratadas con 1 y 10 μM de Kifunensine durante 48 horas. Como puede observarse en la Figura IV.24, la forma O-glicosilada de CD8 α^{Ser} aumenta significativamente luego del tratamiento con Kifunensine, principalmente a la concentración 10 μM . La disminución en el peso molecular se debe a que, además de inhibir la ER-manosidasa I, Kifunensine también inhibe la manosidasa I del Golgi, con lo cual no se produce la maduración del N-oligosacárido. No obstante, el peso molecular de la molécula mutante O-glicosilada y “parcialmente” N-glicosilada es superior al de la molécula nativa O-glicosilada sin N-oligosacáridos (primer carril).

RESULTADOS

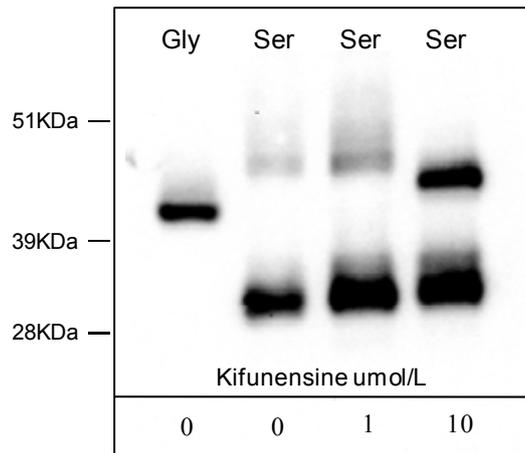


Figura IV.24: Análisis por western-blot de la molécula quimérica UCHL-CD8 α^{Gly} (primer carril) y UCHL-CD8 α^{Ser} sin tratamiento (segundo carril), tratando las células con kifunensine 1 μ M (tercer carril), o con kifunensine 10 μ M (cuarto carril). La detección se realizó con el anticuerpo 144-B dirigido contra la cola citoplasmática de CD8 α .

Puesto que no se recupera la estructura del dominio inmunoglobulina (ausencia de reconocimiento con anti-CD8) tras el tratamiento con Kifunensine, probablemente la molécula mutante tampoco recupere la capacidad de dimerización (a pesar de registrarse un aumento del tránsito RE-Golgi y una mayor expresión en la superficie celular tras el tratamiento con Kifunensine). Para evaluar esta posibilidad, se realizaron estudios bioquímicos en condiciones no reductoras con extractos de células transfectadas con UCHL-CD8 α^{Ser} y tratadas con 10 μ M de Kifunensine.

En el primer carril (Figura IV.25), se observa la forma dimérica de la molécula nativa UCHL-CD8 α^{Gly} , de unos 75-80KDa. En el caso de la molécula mutante UCHL-CD8 α^{Ser} predomina, en los extractos de células sin tratamiento, una forma que no se corresponde ni con el dímero ni con el monómero, de unos 55-60 KDa, que también se observa en la Figura IV.19 A. En el extracto de células tratadas con Kifunensine a una concentración de 10 μ M, esta banda de tamaño intermedio pierde intensidad y se observa una banda compatible con la forma dimérica. Este resultado indica que cuando se inhibe el mecanismo de control de calidad dependiente de N-carbohidratos, una parte de la molécula mutante dimeriza a pesar de tener una conformación inadecuada.

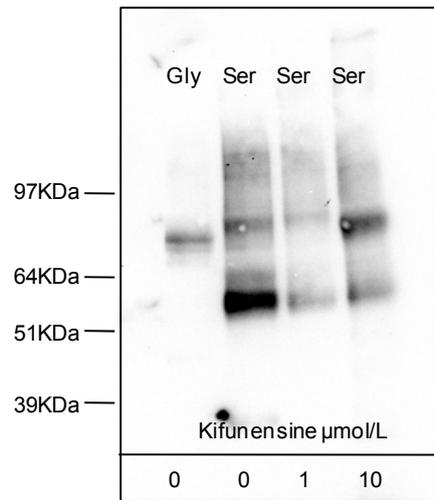


Figura IV.25: Análisis por WB en condiciones no reductoras de la molécula quimérica UCHL-CD8 α^{Gly} (primer carril) y UCHL-CD8 α^{Ser} : sin tratamiento (segundo carril), tratando las células con Kifunensine 1 μ M (tercer carril), o con Kifunensine 10 μ M (cuarto carril). La detección se realizó con el anticuerpo 144-B dirigido contra la cola citoplasmática de CD8 α .

2.2.9 Estudio de la presencia del motivo G-X-Y-X-C en otras moléculas con dominio IgV-like

El motivo **GXYXC** se encuentra conservado en los dominios variables de algunas cadenas γ y δ del TCR, y de algunas cadenas ligeras de las Igs.

Tabla IV.2: Ejemplo de otras moléculas que conservan la secuencia consenso G-X-Y-X-C dentro del dominio IgV-like.

Molécula	Secuencia
CD7	GTYTC
B7 (CD80)	GTYEC
CD86	GLYQC
CMRF35 (CD300L)	GTYWC
IREM2	GSYWG
IRP60	GTYWC
NKP44	GHYWC
CTLA-4	GLYIC
MRC OX-2 (CD200)	GCYMC
Thy-1	GTYTC
PD-1	GTYLC
BTLA	GSYRC
NITR10/NITR11 (Peces)	GEYFC

RESULTADOS

Además, se encuentra presente en los dominios *IgV-like* de muchas otras moléculas, como se indica en la Tabla IV.2.

A pesar de que el motivo GXYXC se encuentra en menos de la mitad de las moléculas con dominio *IgV-like*, llama la atención la total conservación entre los ortólogos de cada una de estas moléculas. Cuando otro aminoácido distinto de la glicina se encuentra en el motivo, tal conservación no existe.

3. Análisis de otras inmunodeficiencias que afectan a la función de los linfocitos citotóxicos.

En los apartados anteriores se ha analizado, a nivel molecular y funcional, la Deficiencia Familiar de CD8. A continuación se analizarán alteraciones en otras moléculas que participan en el reconocimiento del antígeno por parte del linfocito T CD8, en la función efectora de los linfocitos T citotóxicos y las células NKs, o en la homeostasis de dichos linfocitos.

3.1 Deficiencia de MHC clase I

3.1.1 Descripción del caso clínico

Se trata de una mujer de 39 años que presentaba una historia clínica de úlceras en la pierna derecha de 30 años de evolución, desencadenada como consecuencia de un traumatismo a los 10 años (Figura IV.26 A). La lesión inicial fue extendiéndose lentamente hasta cubrir la superficie completa del pie y la pierna derecha. La biopsia mostraba una inflamación granulomatosa necrotizante en la dermis y la hipodermis con infiltración de células gigantes (Figura IV.26 B) y linfocitos.

No se observó respuesta al tratamiento anti tuberculoso, y la PCR para *M. tuberculosis* y los cultivos para hongos fueron negativos. La paciente comenzó a presentar infecciones senobronquiales recurrentes de origen bacteriano desde la pubertad que evolucionaron con el tiempo hacia bronquiectasias. A los 30 años la paciente fue diagnosticada de nefropatía IgA. El tratamiento con corticoesteroides sistémicos produjo una mejora clínica importante.

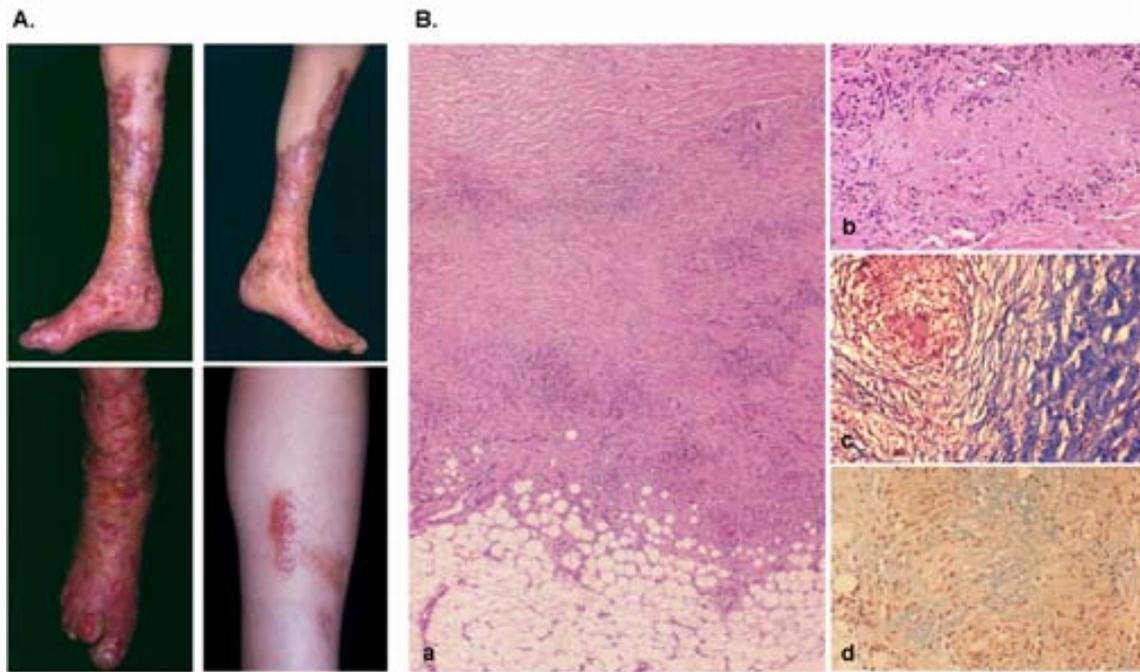


Figura IV.26: A. Manifestaciones cutáneas de la paciente. B: La biopsia de las lesiones muestra una inflamación debido a un granuloma necrotizante. a) que involucra a la dermis y la hipodermis. b) con histiocitos y células de Langerhans multinucleadas y un anillo de linfocitos (tinción hematoxilina-eosina). c) Componente fibroso de la dermis (tinción Massos-tricrómica). d) presencia de mucina (tinción Alcian-blue). Servicio de Dermatología de la Universidad Clínica de Navarra.

La paciente consulta 6 años más tarde debido al desarrollo de una forma agresiva de carcinoma celular epidermoide en la región previamente ulcerada, que obligó a la amputación de la pierna. Posteriormente las lesiones reaparecieron en la otra pierna y el carcinoma epidermoide recidivó, desarrollando metástasis en hígado, pulmón y huesos.

La clínica de infecciones senopulmonares recurrentes con bronquiectasias bilaterales junto con las lesiones granulomatosas crónicas en la piel del pie y la pierna sugería un diagnóstico de Síndrome del Linfocito Desnudo tipo I (BLS-I, *Bare lymphocyte syndrome*)(Zimmer 2005, Gadola 2000, Moins-Teisserenc 1999). Sin embargo, debían excluirse otras enfermedades causantes de lesiones granulomatosas con infiltración de células gigantes (tuberculosis, enfermedad de Wegener). La infección por *M. Tuberculosis* se descartó debido al resultado negativo de la amplificación por PCR. Otra entidad que fue considerada y al igual que la anterior, descartada, fue la vasculitis de Wegener.

3.1.2 Estudios Inmunológicos

3.1.2.1 Análisis del fenotipo linfocitario

En la deficiencia de HLA-I suele encontrarse una disminución de las células CD8+, aunque en la mayoría de los casos descritos se observa un número casi normal, muchas veces debido a una expansión de células TCR $\gamma\delta$ CD8+. Sin embargo, la paciente presentaba valores normales de células TCR $\alpha\beta$ CD8+ y del resto de poblaciones linfocitarias (Tabla IV.3), excepto por la presencia de un 6% de linfocitos T doble positivos (CD3+CD4+CD8+). También llama la atención una población CD3+CD56+, que suele asociarse a procesos tumorales. Su madre e hijas presentaban un fenotipo linfocitario completamente normal.

El resto de parámetros inmunológicos se encontraba dentro de la normalidad.

Tabla IV.3: Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en la paciente.

% del total de linfocitos	Paciente	Valores de Referencia
CD3+	80	61-82
CD3+CD4+	44	36-56
CD3+CD8+	26	13-31
CD3+CD4+CD8+	6	0
CD3+TCR $\gamma\delta$ +	5	0-7
CD3+CD56+	7	2-5
CD19+	4	4-18
CD56+	16	3-18

3.1.3 Estudio de la expresión de HLA-I en la superficie de los leucocitos

Dada la sospecha de BLS-I, se realizó la determinación de la expresión de HLA de clase I. El tipaje serológico de las moléculas de HLA clase I no pudo realizarse, lo cual era sugerente de una baja expresión de estas moléculas. Se analizaron los niveles de expresión de HLA-I por citometría de flujo mediante la tinción con un anticuerpo monoclonal dirigido contra las moléculas HLA-I clásicas (anti-HLA A,B,C clon W6/32, Serotec). Se encontraron valores muy disminuidos respecto de los controles (alrededor de 30 veces), tanto en linfocitos como en monocitos (Figura IV.27). Dado el déficit en la

expresión de las moléculas HLA-I, se diagnosticó como BLS tipo I. Las hijas y la madre de la paciente expresan niveles de HLA-I levemente inferiores a la media de los controles sanos (Figura IV.27).

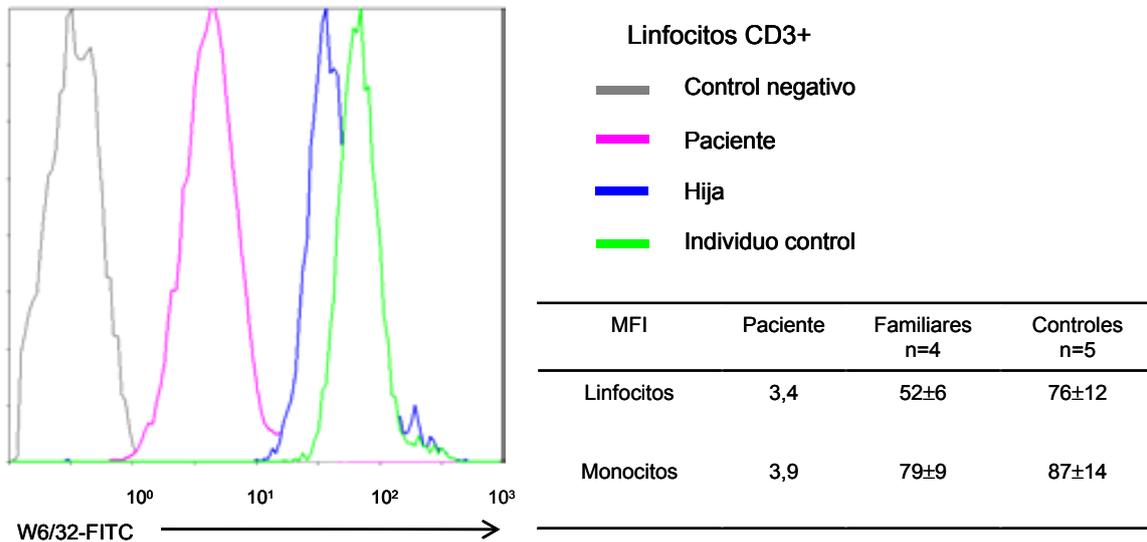


Figura IV.27: Niveles de expresión de HLA-I en linfocitos y monocitos. Se realizó una tinción directa con el AcMo W6/32, que reconoce todas las moléculas HLA-I con muestras de sangre entera (paciente, familiares (n=4) y 5 controles sanos). La figura muestra la comparación en los niveles de expresión en linfocitos de la paciente, una de sus hijas, y un individuo control. En la tabla adjunta se muestran los niveles de expresión de HLA-I en linfocitos y en monocitos (MFI) en la paciente, la media de los familiares directos, y la media de 5 controles sanos.

3.1.4 Análisis molecular de los alelos HLA

Puesto que los genes TAP se encuentran en el cromosoma 6 dentro del complejo principal de histocompatibilidad (concretamente en la región II), la homocigosis de las moléculas de HLA refuerza el diagnóstico de BLS-I. Por ello se llevó a cabo un análisis exhaustivo de los genes de HLA. El tipaje molecular dio como resultado el siguiente genotipo: A*0301/-; Cw*1701/-; B*5001/-; DRB1*0301/-; DQA*0501/-; DQB1*0201/-; DPB1*0401/-. Su madre y las tres hijas eran heterocigotas y portaban este haplotipo. Este resultado (un único alelo en cada loci) sugería la existencia de homocigosis, aunque esto último no se pudo demostrar dada la ausencia del padre, y debido al desconocimiento de los antecedentes familiares.

3.1.5 Estudio genético

Se han identificado tres tipos de defectos que producen deficiencia de HLA-I: defectos en la transcripción de HLA-I (Payne 1983), mutaciones en los genes TAP1 y

RESULTADOS

TAP2 que anulan la función del complejo transportador de péptidos TAP (de la Salle 1999, Furukawa 1999, Matamoros 2001, de la Salle 2002), y defectos en tapasina (Yabe 2002). Los casos de deficiencia de TAP son sintomáticos y se observan niveles de expresión de HLA-I entre 30 y 100 veces inferiores a los individuos control (de la Salle 1994, de la Salle 1999, Teisserenc 1997). En los otros dos tipos de defecto no se observa una sintomatología evidente y los niveles de HLA-I no están tan disminuidos (alrededor de una décima parte).

La paciente presenta una expresión de HLA-I unas 30 veces inferior a la media de individuos sanos, por lo que estudiamos los genes TAP. Ambos genes, *TAP1* y *TAP2*, están compuestos de 11 exones y tienen un tamaño de 8,92 y 10,26 Kb, respectivamente. Son genes con un polimorfismo elevado, según la actualización de julio de 2008 de la base de datos IMGT/HLA existen 7 variantes alélicas de *TAP1* (*0101, *0102N, *020101, *020102, *0301, *0401 y *0501) y cuatro variantes alélicas de *TAP2* (*0101, *0102, *0103 y *0201).

Se realizó el análisis de la secuencia de ambos genes TAP. En el caso de *TAP1* se amplificó el cDNA de toda la región codificante, mientras que *TAP2* se analizó amplificando todos sus exones a partir de DNA genómico. La paciente presenta la variante alélica más frecuente de *TAP1* (*0101: Ile-333, Asp-637) sin ninguna alteración. La secuencia de *TAP2*, se corresponde con la variante *0101 (Val-379, Ala-565, Thr-665, stop 687), excepto por un cambio en homocigosis C>T en la posición 628 (Figura IV.28 A). Este cambio lleva a la sustitución del codón CGA 210, que codifica para una arginina (R), por un codón de terminación TGA (X). De esta forma la terminación de la traducción se produciría al inicio del exón 3, entre el 5º y el 6º dominio transmembrana (Figura IV.28 B). Los familiares directos de la paciente son portadores de la misma mutación, siendo el genotipo de la madre *TAP2**0101^{C628T}/*TAP2**0201 y el de las hijas *TAP2**0101^{C628T}/*TAP2**0101^{WT}.

Esta mutación no ha sido descrita previamente, pero al igual que el resto de las mutaciones reportadas en los genes TAP, introduce un codón de terminación prematuro, y está asociada a un haplotipo HLA determinado. La presencia de un codón de terminación entre el 5º y 6º dominio transmembrana de *TAP2* supone la pérdida total de su función.

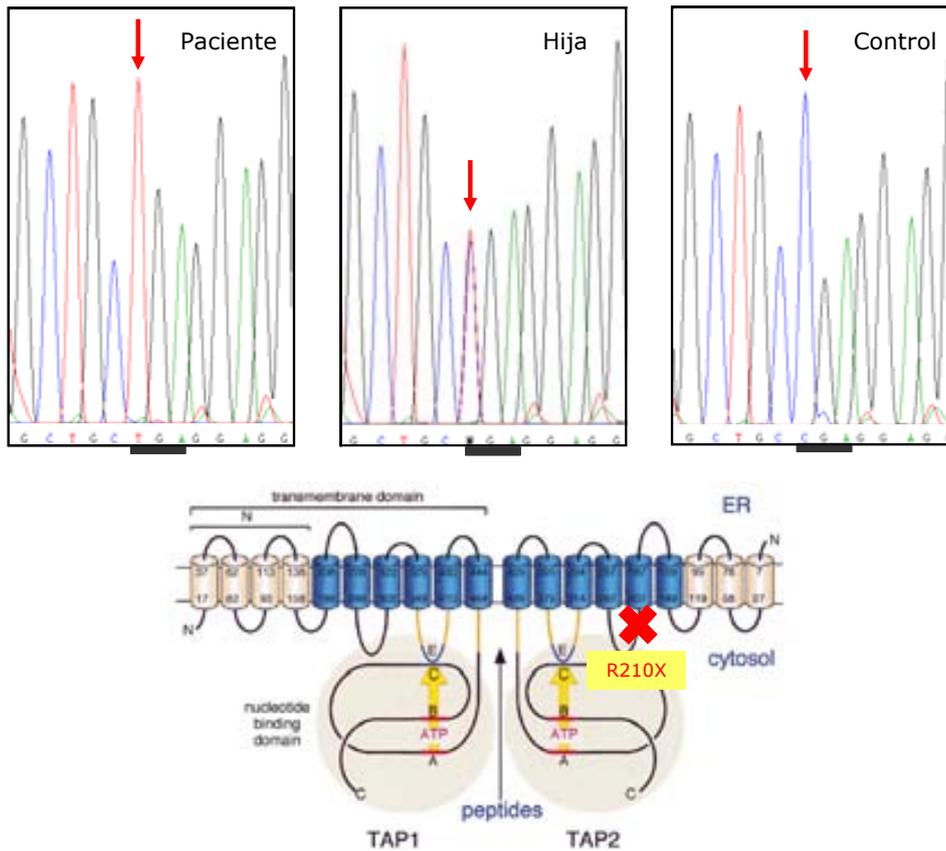


Figura IV.28: Se amplificó la región codificante completa de TAP1 mediante RT-PCR y todos los exones de TAP2 mediante PCR a partir de DNA genómico. Los productos resultantes se analizaron por secuenciación. Se encontró un cambio C>T en homocigocis en el nucleótido 628 de TAP2, en el exón3. En la parte superior de la figura se muestra el trozo de la secuencia del exón 3 donde se encuentra la mutación en la paciente (homocigocis), en una de las hijas (heterocigocis), y en un control sano (secuencia nativa). En la parte inferior de la figura se muestra un esquema del complejo TAP1/TAP2 y la posición donde aparece el codón de terminación (adaptado de Lankat-Buttgereit B and Tampé. *Physiol Rev.* 2002).

La paciente presenta los síntomas característicos de infecciones pulmonares recurrentes que evolucionan a bronquiectasias, y lesiones granulomatosas en la piel, pero es el primer caso de déficit de HLA-I asociado a una transformación neoplásica que se produce sobre las lesiones granulomatosas ulceradas. La falta de TAP podría jugar un papel importante en el proceso de malignización y de metástasis, permitiendo que las células tumorales escapen al reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos y las células NKs.

3.2 Alteración en la función citotóxica. Defectos en la vía de secreción de gránulos

La Deficiencia Familiar de CD8 y la Deficiencia de HLA-I afectan principalmente la fase aferente de la respuesta inmune, es decir, la etapa de presentación del péptido por parte de las moléculas de HLA-I a los linfocitos T CD8+ (a nivel central y periférico) y a la interacción de las células NKs (a través de sus receptores KIRs) con las moléculas de HLA-I presentes en las células diana.

A continuación se estudian dos pacientes en los que se sospecha una deficiencia en el mecanismo de secreción de gránulos citotóxicos, el principal mecanismo que utilizan los linfocitos T CD8 y las células NKs para destruir las células infectadas por virus y las células tumorales. Se han caracterizado varias inmunodeficiencias primarias en las cuales el defecto molecular afecta al mecanismo de secreción de gránulos citotóxicos, y el rasgo común a todas ellas es la aparición del Síndrome de Linfocitosis Hemofagocítica (HLH) en la llamada “fase acelerada de la enfermedad”. El HLH es un síndrome extremadamente grave que se caracteriza por una infiltración de diversos órganos por linfocitos T (principalmente CD8+), histiocitos y macrófagos activados, y que generalmente se desencadena como consecuencia de una infección por CMV o EBV.

3.2.1 Descripción de los casos clínicos

Paciente 1: Niño de 3 años de origen marroquí, hijo de padres consanguíneos. El signo más característico es el color plateado del pelo (pseudo albinismo). Tras una infección por EBV presentó un cuadro de Linfocitosis Hematofagocítica (HLH), y durante el transcurso de la enfermedad presentó tres cuadros más de HLH, sin que se lograra identificar el agente infeccioso desencadenante. Los cuatro episodios de HLH se han logrado controlar farmacológicamente con etopóxido, corticoesteroides y ciclosporina A (protocolo HLH-2004, Henter 2007). No se ha encontrado un donante HLA idéntico para este paciente, por lo que está programado realizar un trasplante de progenitores hematopoyéticos de su madre.

Paciente 2: Niña de dos años y medio, también de origen marroquí e hija de padres consanguíneos. En la exploración física destaca hipopigmentación del cabello y vello corporal, albinismo ocular parcial (retina y mácula), nistagmus, y sintomatología neurológica leve. Ha presentado episodios de broncoespasmo, anemia, y varios

episodios de sepsis. Recientemente desarrolló un cuadro de HLH, que también se controló con el mismo tratamiento farmacológico. Se ha programado realizar un trasplante de progenitores hematopoyéticos de un donante no emparentado 100% compatible.

3.2.1.1 Examen microscópico del cabello y extendidos de sangre periférica

El examen microscópico del pelo del paciente 1 muestra grandes acúmulos de pigmentos con una distribución heterogénea en la parte central, como puede observarse en el panel del medio de la Figura IV.29 A. Este patrón es compatible con Síndrome de Griscelli (SG). En el panel de la izquierda se muestra la distribución homogénea de los pigmentos en un individuo normal de cabello castaño. En el síndrome de Chediak-Higashi (CHS), los pigmentos forman agregados más pequeños, como en la imagen que se observa en el paciente 2 (Figura IV.29 A, derecha).

En el extendido de sangre periférica del paciente 2 se observan leucocitos (basófilos, neutrófilos y linfocitos) con gránulos gigantes (Figura IV.29 B), mientras que el extendido de sangre del paciente 1 no reveló ninguna anomalía.

3.2.1.2 Diagnóstico clínico diferencial

El albinismo parcial que presenta el paciente 1, junto con el patrón microscópico de distribución heterogénea de los pigmentos en grandes acúmulos, sugerían un Síndrome de Griscelli (SG). Por otra parte, la presencia de HLH y la ausencia de afectación del sistema nervioso, eran muy indicativos de SG tipo II. En cambio, el SG tipo I se caracteriza por la combinación de albinismo parcial y afectación del sistema nervioso, mientras que el SG tipo III solo produce hipopigmentación. La paciente 2 presenta hipopigmentación, predisposición a cuadros infecciosos, neutropenia leve, HLH, y un signo muy característico, casi patognomónico, del Síndrome de Chediak-Higashi (CHS) que se observa en los extendidos de sangre periférica: la presencia de gránulos gigantes en el interior de los granulocitos (Spritz 1998, Shiflett 2002, Ward 2002). Por todo lo anterior, la paciente fue diagnosticada como CHS.

RESULTADOS

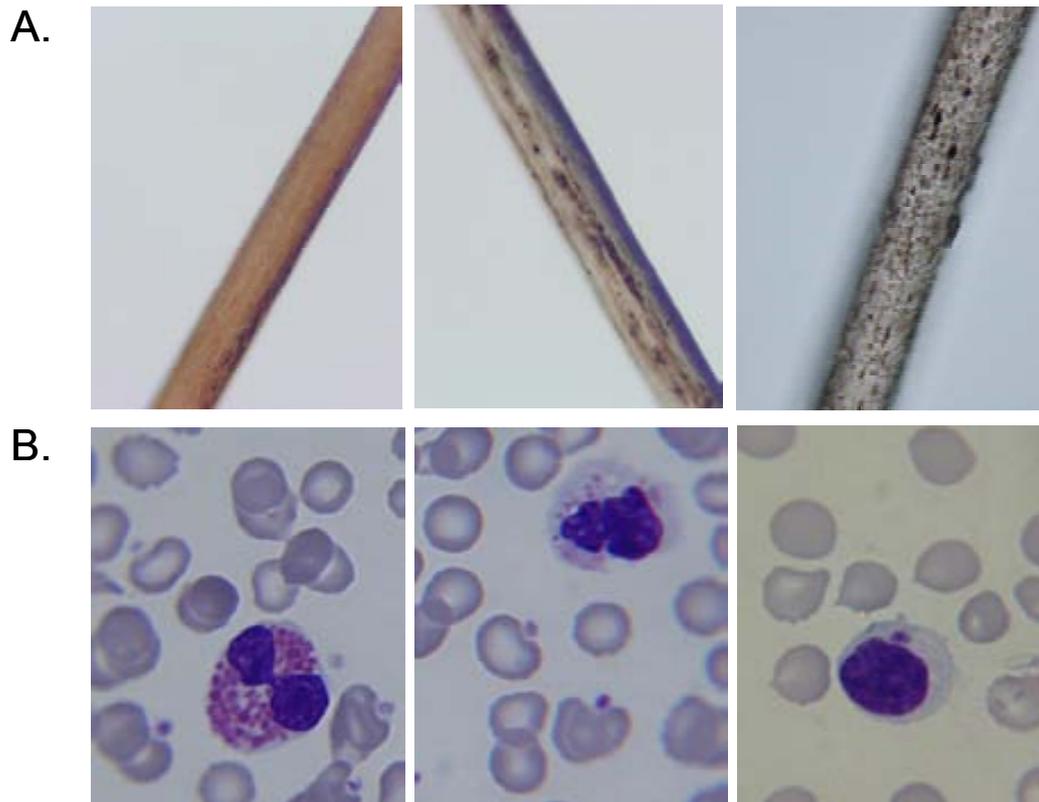


Figura IV.29: Examen microscópico de cabello y extendido de sangre periférica. A: cabello perteneciente a un individuo normal (izquierda), al paciente 1 (centro), y al paciente 2 (derecha). B: extendido de sangre correspondiente al paciente 2, donde se observan basófilos (izquierda), neutrófilos (centro) y linfocitos (derecha) con gránulos gigantes.

3.2.2 Estudios inmunológicos

3.2.2.1 Estudio del fenotipo linfocitario

El paciente 1 presenta un fenotipo linfocitario normal excepto por un aumento en el número de células $CD3+TCR\gamma\delta+$ (Tabla IV.4). Sin embargo, el análisis de marcadores de activación mostró que el 50% de los linfocitos $CD3+$ eran positivos para $CD25$ (cadena α del receptor de la IL-2), un valor muy superior al normal. El paciente 2 tiene un porcentaje de linfocitos T menor al valor normal, y también muestra un valor aumentado en el porcentaje de linfocitos $CD3+TCR\gamma\delta+$ (Tabla IV.4).

Tabla IV.4: Estudio de las subpoblaciones linfocitarias en ambos pacientes.

% del total de linfocitos	Paciente 1 (3 años)	Paciente 2 (2 años)	Valores de Referencia
CD3+	76	53	61-85
CD3+CD4+	37	31	36-56
CD3+CD8+	25	13	13-31
CD3+TCR $\gamma\delta$ +	13	12	0-7
CD19+	16	35	4-18
CD56+	5	4	3-18

3.2.2.2 Estudio de las inmunoglobulinas séricas

En el paciente 1 los niveles de inmunoglobulinas en suero estaban ligeramente disminuidos, mientras que en la paciente 2, los valores séricos de inmunoglobulinas eran normales, excepto por un ligero aumento de la IgA y la IgE (Tabla IV.5).

Tabla IV.5: Valores séricos de Inmunoglobulinas.

Inmunoglobulina sérica	Paciente 1	Paciente 2	Valores de Referencia
IgG	540	981	420-1200 mg/dl
IgA	19	209	25-154 mg/dl
IgM	25	130	35-192 mg/dl
IgE	4,5	35	1-25 UI/ml

3.2.3 Estudios funcionales

Tanto el SG como el CHS se caracterizan por una disminución muy marcada en la capacidad citotóxica de las células NK y los linfocitos T CD8+. La clínica de los pacientes, además, sugería un defecto de este tipo. Por ello se realizaron diversas pruebas para estudiar específicamente la función de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos CD8+.

RESULTADOS

3.2.3.1 Actividad NK

Se determinó la capacidad de las células NKs para lisar las células diana K562, que no poseen moléculas de HLA-I. La actividad citotóxica NK es proporcional al ^{51}Cr que se libera como resultado de la lisis de las células diana, previamente incubadas en medio de cultivo con ^{51}Cr . Como se observa en la Figura IV.30, las células NKs del paciente 1 tienen una actividad disminuida, con una capacidad citolítica del 40% en comparación a un individuo control. La actividad NK del paciente 2 se encuentra aún más afectada, alcanzando solo un 16% de la actividad de un control sano.

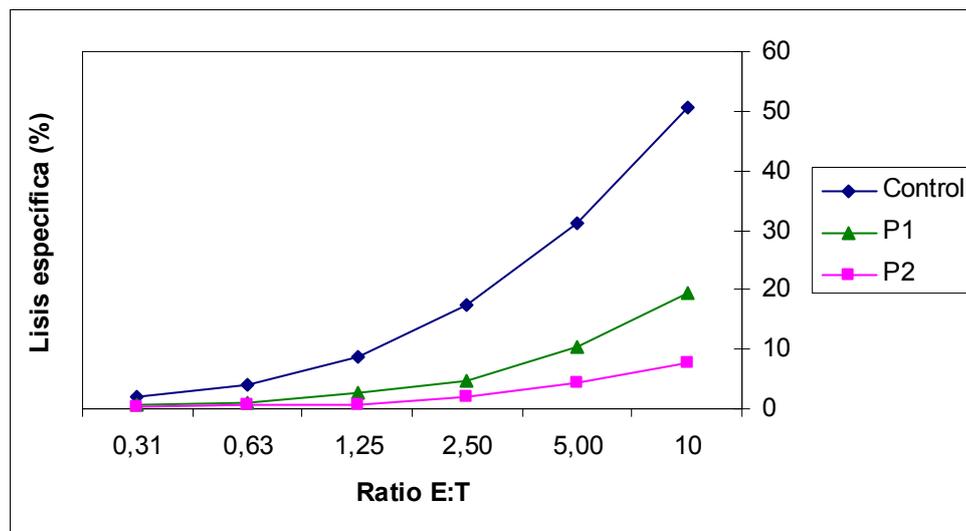


Figura IV.30: Se aislaron las PBMCs de los pacientes (P1, P2) y de un individuo y se determinó la actividad NK enfrentando distintas diluciones de PBMCs con las células diana K562 previamente incubadas con ^{51}Cr , por triplicado. La actividad NK es proporcional a la cantidad de ^{51}Cr liberado por las células diana durante su lisis, que se calcula como: % citotoxicidad = $(\text{cpm muestra} - \text{cpm liberación espontánea}) / (\text{cpm lisis máxima} - \text{cpm liberación espontánea}) \times 100$. La liberación espontánea se calcula en pocillos que contienen las células K562 en medio de cultivo. La lisis máxima se calcula en los pocillos que contienen las células K562 con 0,1% SDS.

3.2.3.2 Capacidad de movilización de gránulos citotóxicos de las células NKs

Como consecuencia de la degranulación, las CTLs expresan la proteína-1 de membrana asociada a los lisosomas (CD107a), de forma que la liberación de gránulos citotóxicos es proporcional a los niveles de expresión de CD107a en la superficie celular. El día anterior al ensayo, se extraen las células mononucleares de los pacientes y un control y se incuban en presencia de IL-2 para activar las células NKs. El ensayo consiste en incuban las NKs durante unas horas con las células diana K562 y un anticuerpo anti-CD107a. Posteriormente, en la segunda fase de la incubación se añade un inhibidor del proceso de tránsito retrógrado desde la membrana, (inhibidor del

transporte de proteínas hacia el Golgi) de forma que a medida que los gránulos citotóxicos se van fundiendo con la membrana plasmática, el anticuerpo se va uniendo a CD107a en la superficie celular. En un individuo control, la diferencia en los niveles de expresión de CD107a de las células incubadas con K562 respecto de la expresión en las células sin K562 es del 30%, como se observa en la Figura IV.31. En los pacientes esta diferencia es nula, indicando que no se produce la fusión de los gránulos con la membrana plasmática debido a la afectación de alguno de los pasos de movilización/fusión de gránulos. Estos resultados concuerdan con la baja actividad NK que tienen las células de los pacientes.

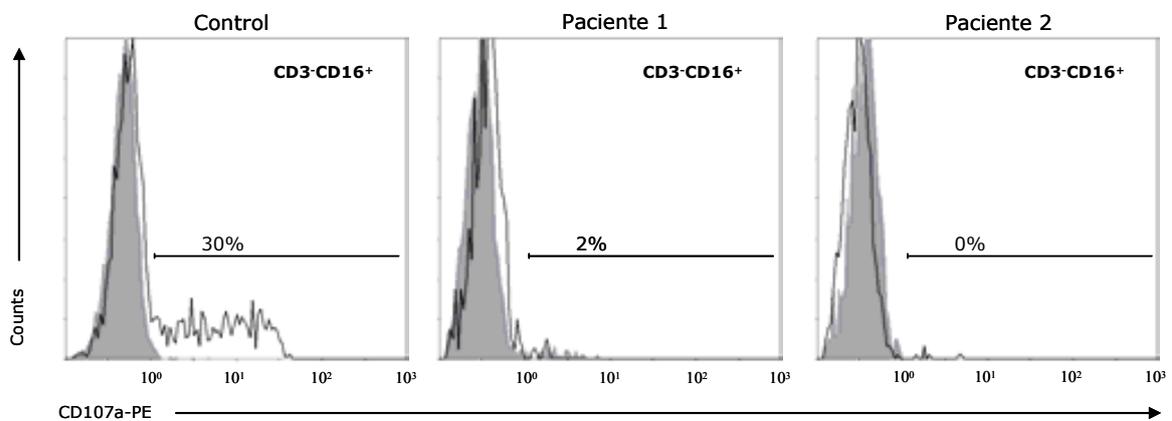


Figura IV.31: Las PBMCs de los pacientes (P1, P2) y de un individuo control se cultivaron 24 horas en presencia de IL-2. Al día siguiente se enfrentaron las PBMCs con las células NKs y se cultivaron durante una hora en presencia de CD107a-PE (BD). Se añadió monensina y se incubó durante dos horas más. La expresión de CD107a (histogramas negros sin relleno), proporcional a la secreción de gránulos, se determinó en la población NK CD3-CD16⁺. La expresión de CD107a en células incubadas en ausencia de las células diana K562 representa la degranulación espontánea (histogramas grises). Izquierda: Control. Centro: Paciente 1. Derecha: Paciente 2.

3.2.3.3 Actividad CTL mediada por liberación de gránulos citotóxicos

La liberación de gránulos de perforina y granzimas es el mecanismo principal que emplean los linfocitos T CD8 citotóxicos para lisar las células diana. Para investigar si dicho mecanismo se encontraba afectado en los pacientes, se evaluó la capacidad de las células T citotóxicas CD8⁺ (activadas mediante OKT3) mediante ensayo de liberación de ⁵¹Cr, utilizándose como células diana la línea L1210.3 carente de Fas. De esta forma la lisis de las células diana está mediada exclusivamente por la liberación de gránulos citotóxicos por parte de las CTL. A esta prueba se la denomina “ensayo de citotoxicidad dirigida”, puesto que el anticuerpo anti-CD3 actúa de puente, al unirse al mismo tiempo a los receptores Fc de las células diana y al complejo TCR-CD3 de las

RESULTADOS

células efectoras. En comparación a dos individuos control, las células CD8+ de los pacientes prácticamente no tienen capacidad citolítica (Figura IV.32) mediante el mecanismo de liberación de gránulos de perforina y granzimas.

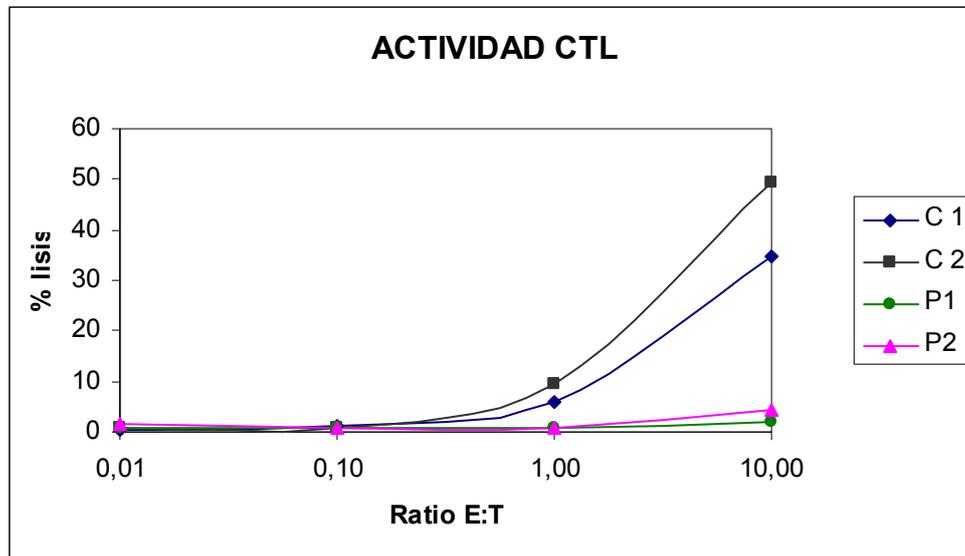


Figura IV.32: Las PBMC de los pacientes (P1, P2) y de dos controles (C1, C2), se cultivaron en presencia de PHA e IL2 durante 24 horas, y se mantuvieron en cultivo durante 5 días más con IL2. Se determinó la actividad CTL enfrentando distintas diluciones de PBMCs (previamente se determinó el porcentaje de células CD3+CD8+ para calcular las relaciones CTL: célula diana) con las células diana L1210.3 previamente incubadas con ^{51}Cr , por triplicado. La actividad CTL es proporcional a la cantidad de ^{51}Cr liberado por las células diana durante su lisis, que se calcula como: % citotoxicidad = $(\text{cpm muestra} - \text{cpm liberación espontánea}) / (\text{cpm lisis máxima} - \text{cpm liberación espontánea}) \times 100$. La liberación espontánea se calcula en posillos que contienen las células L1210.3 en medio de cultivo. La lisis máxima se calcula en los posillos que contienen las células L1210.3 con 0,1% SDS.

3.2.4 Estudio genético

El Síndrome de Griscelli (SG) tipo I está causado por mutaciones en el gen de la Miosina Va, implicada en el transporte vesicular celular, y que es especialmente abundante en las neuronas y en los melanocitos. En los pacientes con SG tipo II se han identificado mutaciones en el gen que codifica para Rab27a, que se expresa en melanocitos, leucocitos, plaquetas y células de otros tejidos, a excepción del cerebro. Esto explica por que los pacientes con SG tipo II no presentan alteraciones neurológicas primarias, aunque sí pueden presentar daños neurológicos secundarios a los cuadros de hemofagocitosis. Las mutaciones en el gen que codifica para la melanofilina, un efector de Rab27a que se expresa específicamente en los melanocitos, causan el SG tipo III que se caracteriza por la hipopigmentación de la piel y el vello corporal. El gen que se encuentra afectado en el Síndrome de Chediak-

Higashi (CHS) es *LYST*, que codifica para una proteína cuya función no se conoce con certeza pero que parece estar implicada en el tráfico proteico de las organelas. Se observan cuerpos de inclusión gigantes en todas las células que tienen lisosomas, melanosomas y gránulos de secreción, por lo que parece estar afectado un paso común necesario para la biogénesis, estructura o función de estas organelas intracelulares.

Puesto que los signos y síntomas de la paciente 2 no ofrecían dudas en cuanto al diagnóstico de CHS, y debido a que el gen *LYST*, responsable de la enfermedad, es un gen muy extenso (55 exones), se decidió no realizar el diagnóstico genético. Sí se realizó el estudio genético en el paciente 1, con diagnóstico preliminar de SG tipo II. Se decidió analizar en primer lugar el gen *RAB27A*, puesto que las mutaciones en este gen están asociadas al SG tipo II. La proteína está involucrada en el transporte de gránulos, y su afectación podría explicar tanto la alteración en la pigmentación del pelo como en la liberación de gránulos por las células citotóxicas NK y CD8+. Se realizó una retrotranscripción y amplificación del cDNA de Rab27a. En el paciente se obtiene una banda de un peso molecular menor al del control (Figura IV.33 A). El producto de amplificación se analizó por secuenciación y se vio que faltaban los exones 3 y 4 (Figura IV.33 B).

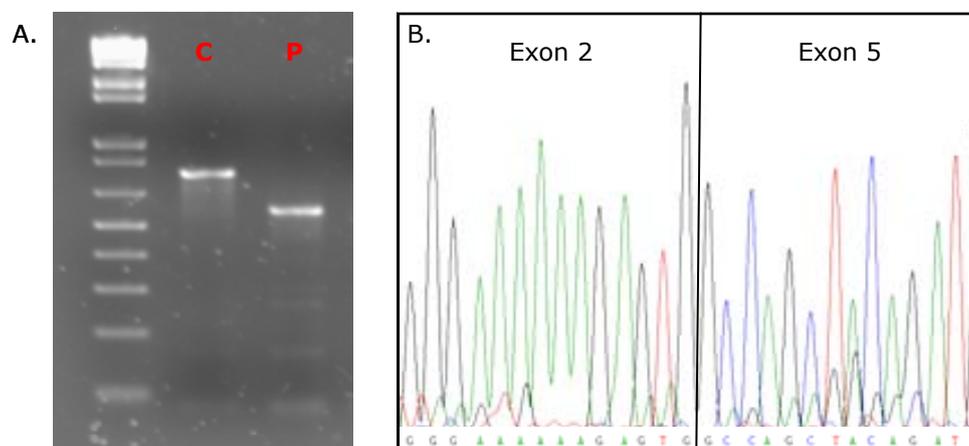


Figura IV.33: RT-PCR de la región codificante de Rab27a. Izquierda: se muestra el producto de amplificación que se obtiene en el control (C) y en el paciente 1 (P), de menor peso molecular. Derecha: fragmento de la secuencia del producto de amplificación del cDNA de Rab27a donde se observa el pasaje del exón 2 al exón 5.

La falta de estos exones provoca el corrimiento de la pauta de lectura y la aparición de un codón de terminación en el residuo 64. Los dominios de unión a GTP, esenciales para la función de Rab27a, estarían ausentes (Rab27a tiene 221 aminoácidos), indicando que la falta de los exones 3 y 4 en homocigosis produciría la

RESULTADOS

perdida total de la función de la proteína. Se realizó el análisis genómico para identificar la causa de la pérdida de los exones 3 y 4, que habitualmente obedece a mutaciones en los motivos que regulan el *splicing* durante la maduración del mRNA. En el paciente no se obtuvo amplificación ni para el exón 3 ni para el 4, utilizando *primers* de las regiones intrónicas adyacentes a los respectivos exones, mientras que en un individuo control se obtuvieron los fragmentos de amplificación de las medidas correspondientes a cada exón. Esto sugería que el paciente tenía una deleción genómica que afectaba los exones 3 y 4 y que no existía un problema de *splicing*. El resto de los exones presentaba el tamaño esperado. Para estudiar los límites de la deleción, se intentó una amplificación con los *primers* genómicos 2F/5R, pero no se obtuvo ningún producto, seguramente debido a que la secuencia era demasiado larga. Se diseñó un nuevo primer en el intrón 2, a 1,320 pb del final del exón 2 (int2F), para usar en combinación con 5R. Al amplificar con esta pareja de *primers* se obtuvo un fragmento de aproximadamente 4500 pb. Si la deleción no existiera, este fragmento debería medir 9691 pb (ver Figura IV.34), lo cual indica que la deleción tendría una longitud superior a 5000 pb. Para acotar los extremos de la deleción, se realizaron una serie de digestiones con endonucleasas de restricción del producto de amplificación int2F/5R. Para interpretar el patrón de restricción del fragmento delecionado se comparó con el patrón “teórico” del fragmento completo con ayuda del software vectorNTI (Invitrogen).

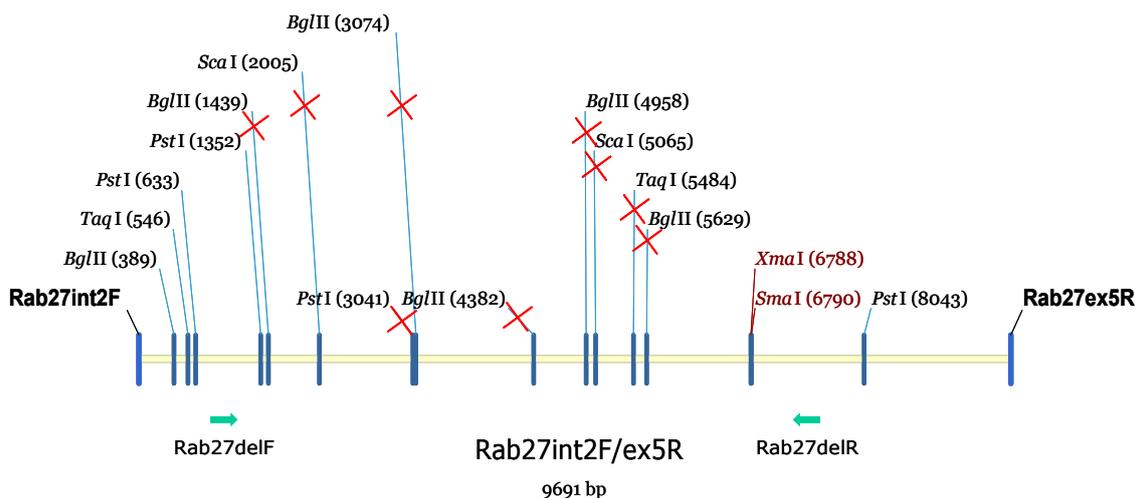


Figura IV.34: Mapa de restricción del fragmento de amplificación de Rab27a con primers genómicos int2F/ex5R. Se indican con una cruz roja los sitios de corte ausentes según la comparación con la simulación del fragmento no delecionado (VectorNTI, Invitrogen).

En la Figura IV.34 se indican los enzimas utilizados y la presencia o ausencia (indicada con una cruz roja) de la diana de restricción. De esta forma se situó el extremo 5' de la delección entre 1352 (Pst I) y 1439 (Bgl II), y el extremo 3' entre 5629 (Bgl II) y 6788 (Xma I).

Una vez acotados los extremos de la delección, se diseñaron nuevos *primers*, (Rab27del-F y Rab27del-R) en las posiciones que se indican en la Figura IV.34. Se amplificó y se analizó por secuenciación el producto resultante de 330 pb. En la Figura IV.35 se observa como la secuencia pasa desde la zona indicada en el intrón 2 a la indicada en el intrón 4 con una secuencia corta entre ellos (CTAATTT).

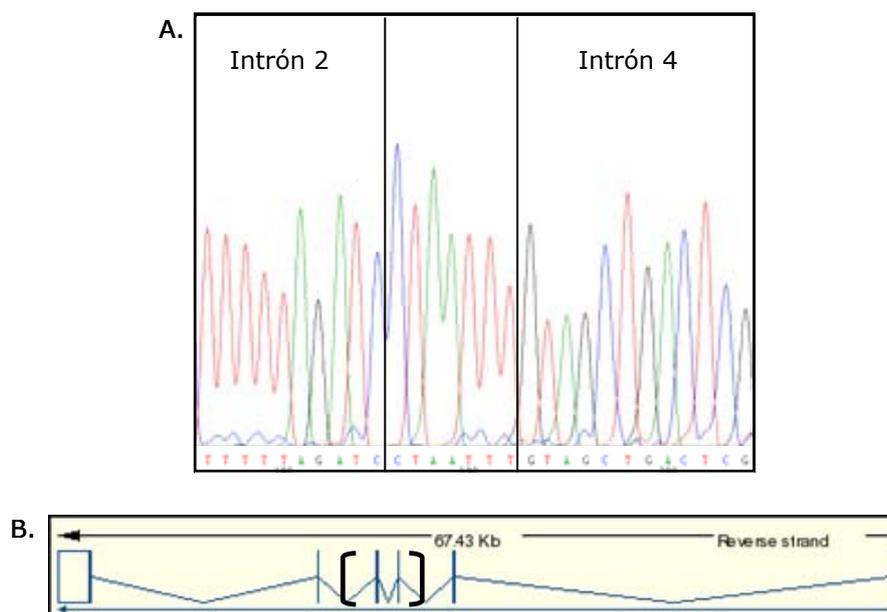


Figura IV.35: **A.** Fragmento de la secuencia del producto de amplificación de *RAB27A* con los primers genómicos Rab27del-F/Rab27del-R. **B.** Esquema de la zona afectada por la delección del gen *RAB27A*.

La delimitación exacta de los extremos de la delección permite identificar los individuos portadores de la delección simplemente analizando la presencia o no del producto de amplificación de (330) pb, a partir de DNA genómico, con los *primers* Rab27del-F y Rab27del-R. En los individuos que no son portadores de la delección no se produce amplificación debido a la distancia excesiva que separa ambos *primers*. En la Figura IV.36, puede observarse la banda correspondiente al fragmento de amplificación en el paciente (segundo carril) y en todos sus familiares directos (carriles 3-6), indicando que todos ellos eran portadores de la delección.

RESULTADOS

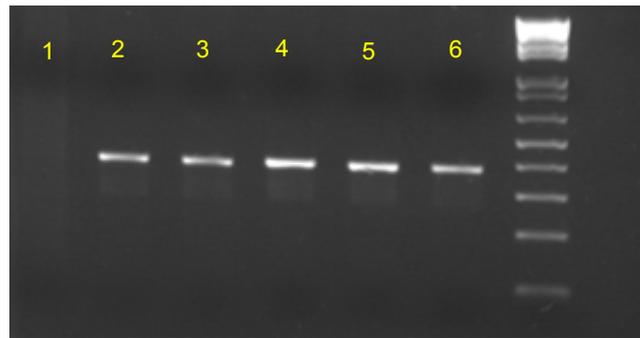


Figura IV.36: Amplificación a partir de DNA genómico del fragmento lindante a la deleción del gen *RAB27A*. 1, individuo control. 2, paciente. 3, madre. 4, padre. 5, hermana mayor. 6, hermana menor.

3.3 Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune: ALPS

En el apartado anterior se revisaron casos clínicos con alteración en la función citotóxica debido a defectos en la vía de secreción de gránulos. En el presente apartado se estudian varios casos en los que el defecto en la citotoxicidad involucra la segunda vía efectora de las células citotóxicas: la vía de apoptosis dependiente de Fas.

3.3.1 Descripción de los casos clínicos

Se estudiaron pacientes y familiares pertenecientes a cinco familias distintas. En la Figura IV.37 se muestran los árboles genealógicos, indicándose con el número correspondiente los pacientes o familiares estudiados.

Familia A: El paciente (III1) es un niño caucásico de 4 años de edad que presenta esplenomegalia leve y pancitopenia moderada de tres meses de evolución, y que acude al hospital por un proceso infeccioso no relacionado. No se observan adenopatías, y los padres y abuelos no refieren ninguna alteración evidente (II1, madre; II2, padre; I1, abuela paterna; I2, abuelo paterno).

Familia B: El paciente (II1) es un varón de 11 años, de origen caucásico, que presenta desde los 4 años dolor abdominal recurrente y masa abdominal localizada en hipocondrio izquierdo. En la exploración ecográfica se observa una esplenomegalia marcada y varias linfadenopatías mesentéricas, retroperitoneales y cervicales. Presenta una leucopenia cíclica pronunciada, con valores mínimos de 200 leucocitos/ μ L y una trombocitopenia leve. En el aspirado de médula ósea, coincidente con valores mínimos de neutrófilos en sangre periférica, se observa una hipoplasia moderada de la serie mieloide con predominio de formas intermedias de maduración.

El padre del paciente es desconocido. El análisis de antecedentes familiares por vía materna no revela ningún dato de interés.

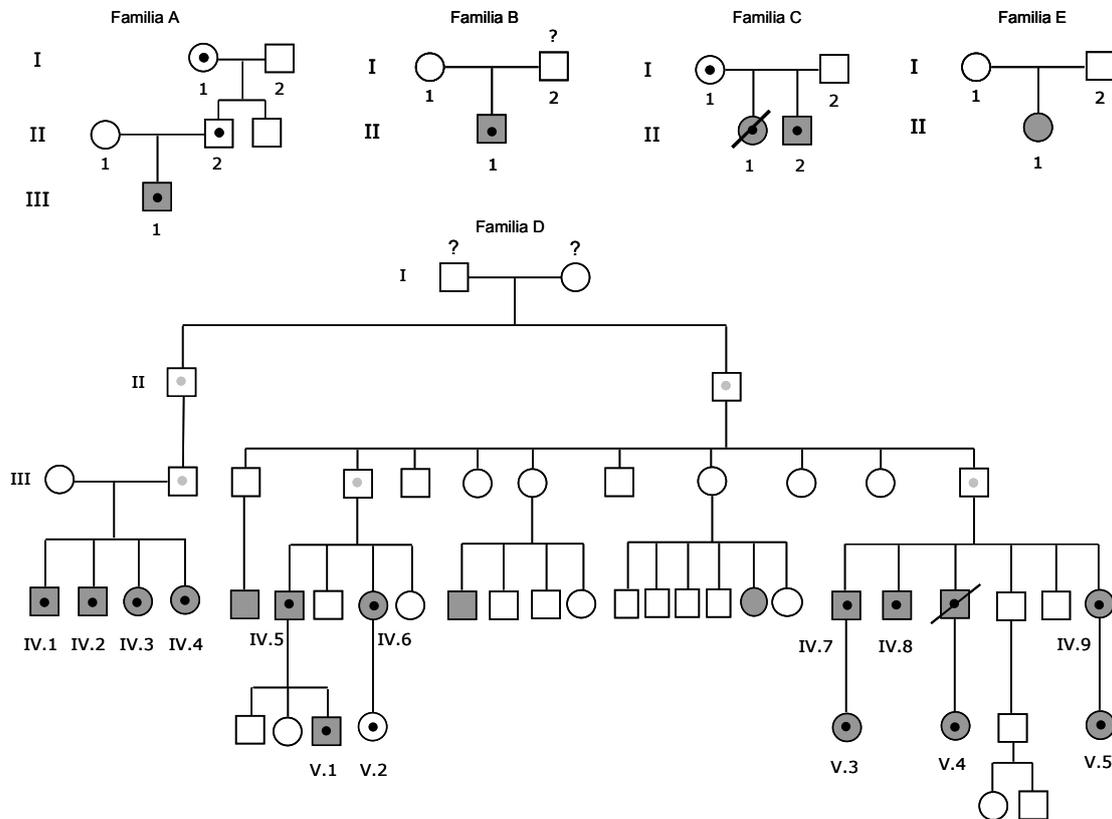


Figura IV.37: Árboles genealógicos de las 5 familias con ALPS. Los puntos negros indican la presencia de una mutación en Fas. Los individuos en los que no se estudió la presencia de la mutación pero que serían portadores obligados se indican con puntos grises. El sombreado gris indica manifestación clínica de la enfermedad.

Familia C: Varón de 10 años de edad, que presenta esplenomegalia moderada y trombocitopenias (II2). Como antecedentes familiares destaca una hermana fallecida (II1) que presentaba una severa afectación sanguínea (anemias y trombocitopenias) por lo que se decidió realizar una esplenectomía. La paciente falleció debido a una sepsis por neumococos.

Familia D: Es una familia extremadamente extensa, de origen caucásico y no consanguínea, que reside en Tenerife (Canarias). Se estudiaron muestras de varios individuos (indicados con el número correspondiente en la Figura IV.37), con signos y síntomas característicos de ALPS, con el fin de realizar el diagnóstico molecular. En cuanto a las manifestaciones clínicas se observa una gran variabilidad: varios individuos de esta familia (representados en la rama derecha del árbol genealógico) presentaron esplenomegalia de comienzo temprano, linfadenopatías leves no

RESULTADOS

malignas, y alteraciones autoinmunes: anemia hemolítica, plaquetopenia y/o neutropenia. Sin embargo, en otros miembros de la familia las manifestaciones clínicas fueron mucho menos evidentes y el comienzo de la enfermedad más tardío. Uno de los pacientes (V1) presentó una uveitis autoinmune.

Algunos integrantes de la familia que no pudieron ser estudiados también presentaban clínica (indicados con sombreado gris).

Familia E: Niña de 1 año de edad, que ingresa al servicio de pediatría debido a fiebre de origen desconocido. En la exploración se encontró una esplenomegalia pronunciada y adenopatías. En los estudios de laboratorio se detectó anemia y trombocitopenia. El análisis de antecedentes familiares no revela ningún dato de interés.

3.3.2 Estudios inmunológicos

3.3.2.1 Análisis del fenotipo linfocitario

El signo más característico de los pacientes con ALPS es el aumento de la proporción de linfocitos T doble negativos (DN) con TCR $\alpha\beta$ (Bleesing 2001, Primary Immunodeficiency Diseases. 2nd Edition). En los familiares directos de los pacientes portadores de la mutación suele observarse un porcentaje elevado de esta población DN, a pesar de no presentar ninguna manifestación clínica. Por este motivo siempre que fue posible se realizó el estudio del fenotipo linfocitario en los familiares directos. El número de linfocitos CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) se encontró elevado en todos los pacientes y en algunos de sus familiares directos (A-I2, C-I1), oscilando entre un 2 y un 15%. En algunos pacientes (D-V1, D-V4) se encontró un porcentaje elevado de linfocitos B (linfocitosis B), pero en la mayoría de ellos los valores se encontraron en el límite superior. Prácticamente en todos los casos se observó una disminución del cociente CD4/CD8. En la Tabla IV.6 se muestra el resultado del estudio de las subpoblaciones linfocitarias para cada caso.

Tabla IV.6: Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en los pacientes con sospecha de ALPS y familiares directos.

% del total de linfocitos	CD3+				CD3-	
	CD8+	CD4+	TCR $\gamma\delta$	TCR $\alpha\beta$ DN	CD19+	CD56+
Rango normal	13-31	36-56	0-7	<1	4-17	3-18
A-III1	31	34	8	4	15	5
A-II1	19	49	2	<1	11	17
A-II2	17	43	3	8	11	14
A-II3	39	42	2	0	6	7
A-III1	16	49	<1	1,3	16	15
A-III2	34	40	<1	<1	14	11
B-II1	27	27	15	5	16	6
C-II2	18	33	9	15	11	9
C-I1	44	33	1	6	5	10
C-I2	21	53	2	0	9	13
D-IV1	48	26	3	2	11	7
D-IV2	36	26	3	5	13	10
D-IV3	44	25	4	2,4	12	8
D-IV5	38	36	1,6	2	7	16
D-V1	22	30	2	2	40	2
D-IV6	44	26	1,4	4	13	14
D-V2	34	32	8	3	7	14
D-IV7	61	19	1,7	2,2	10	5
D-IV8	33	37	1	1,6	7	13
D-IV9	32	50	1	2	11	5
D-V4	31	24	5	6	24	8
D-V5	44	29	4	3	10	4
E-II1	18	25	5	12	17	15
E-I1	31	40	4	1	16	6
E-I2	26	43	2	1	9	19

RESULTADOS

3.3.2.2 Estudio de los niveles séricos de inmunoglobulinas e IL-10

En los pacientes en los que se sospecha un ALPS, el hallazgo de hipergammaglobulinemia apoya el diagnóstico, encontrándose generalmente un aumento de IgG e IgA en los casos en que se confirma la enfermedad. También se ha observado una correlación positiva entre los niveles séricos de IL-10 y las manifestaciones clínicas (Magerus–Chatinet 2009).

Tabla IV.7: Valores séricos de inmunoglobulinas en los pacientes con sospecha de ALPS. El asterisco en la paciente E-II1 indica que el resultado debe compararse con los valores normales (VN) correspondientes a su edad, también indicados con *. N.D, no determinado.

	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgE UI/ml	IL-10 (pg/ml)
VN > 10a	700-1600	70-400	40-230	3-160	<5
*VN 1a	200-1000	16-85	25-149	0,1-15	<5
A-III1	743	54	55	706	18
A-II2	979	269	108	1145	20
B-II1	2030	634	84	3039	47
C-II2	2000	373	41	36	63
C-I1	1220	182	29	N.D	N.D
D-V1	1630	349	35	N.D	N.D
D-V4	1350	544	29	36	N.D
D-V5	2210	536	42	26	N.D
D-IV7	1460	244	87	97	12
D-IV8	1290	446	60	9	10
D-IV9	976	317	119	367	7
*E-II1	2270	445	53	338	170
E-I1	1240	310	260	122	ND
E-I2	1130	310	107	529	ND

Los niveles de IgG se encontraron elevados en la mayoría de los pacientes estudiados (en alguno de los casos en los que se han determinado las subclases, el mayor aumento parece concentrarse en la IgG1). Muchos de los pacientes también presentaron niveles elevados de IgA. Asimismo, en todos los casos estudiados se encontraron valores elevados de IL-10. En algunos familiares directos portadores de la

mutación en los que no se observa clínica sí que se encontraron niveles elevados de uno o varios subtipos de inmunoglobulinas y/o de IL-10, al igual que ocurría en la población T DN (A-II2). Un dato muy constante es la presencia de niveles elevados de IgE, aunque ninguno de los pacientes presenta clínica de alergia o atopía. En la **Tabla IV.7** se muestran los valores séricos de inmunoglobulinas y de IL-10.

3.3.3 Estudios funcionales: análisis de la apoptosis mediada por Fas

Los pacientes con ALPS tienen, por definición, un defecto de la vía de apoptosis mediada por Fas en estudios *in vitro*. La evaluación de esta vía se analizó en células PBMCs estimuladas con PHA durante 24 horas, cultivadas en presencia de IL-2 durante 5 días más, y posteriormente enfrentadas con el anticuerpo agonista anti-Fas (CH11, isotipo IgM). Transcurridas 20 horas desde la adición del anticuerpo, se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje de linfocitos negativos para yoduro de propidio y positivos para la tinción con anexina-V (células apoptóticas). La anexina-V reconoce la fosfatidilserina traslocada a la cara externa de la membrana celular en las células apoptóticas. El estudio se realizó en todos los pacientes, excepto en la familia D en la que solo se analizaron dos casos. En todos los pacientes se encontró un defecto de la apoptosis inducida por Fas. En la Figura IV.38 se muestra el análisis de la tinción con anexina-V en un individuo control y en uno de los pacientes (A-III1).

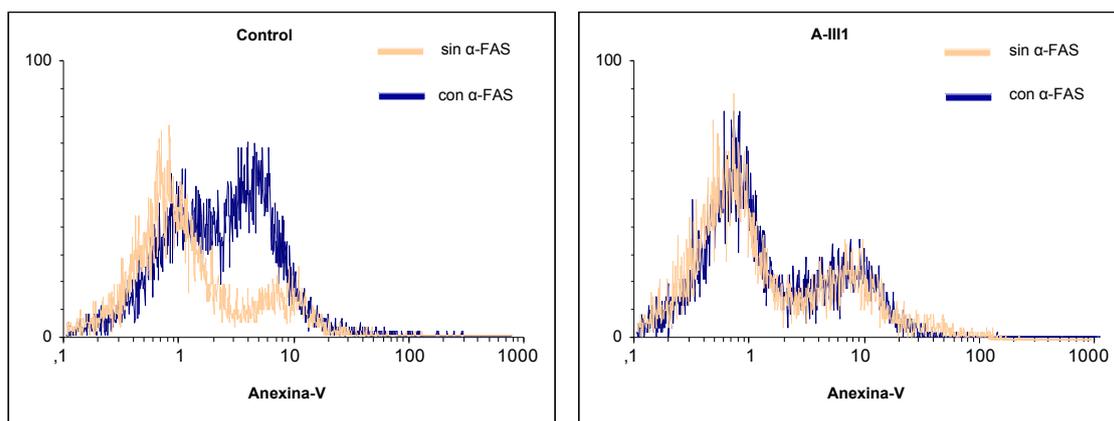


Figura IV.38: Ensayo de apoptosis inducido por Fas. Las PBMCs de pacientes y controles se estimularon con PHA durante 24 horas, se lavaron, y se cultivaron en presencia de IL-2 durante otros 5 días. Se ajustaron las células a $4 \cdot 10^5$ cl/ml y se distribuyeron en placas de 48 pozos (1 ml/pozo). A la mitad de los pozos se añadió 1 μ L del anticuerpo anti-Fas (CH11). Tras 20 horas se determinó el porcentaje de células negativas para yoduro de propidio y positivas para anexina-V.

Asimismo, se evaluó en paralelo la incidencia de la mortalidad celular secundaria a la apoptosis mediada por Fas mediante tinción con azul de tripán de las

RESULTADOS

células del cultivo y se observó una correlación entre este valor y los datos obtenidos mediante la tinción con anexina-V.

3.3.4 Estudio genético

La mayoría de los casos descritos de Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune pertenecen al tipo ALPS Ia (aproximadamente un 70%), que es producido por mutaciones en heterocigosis en el gen *TNFRSF6*, que codifica para la proteína Fas (Sneller 1997; ALPSbase: Database of mutations causing human ALPS). Las mutaciones en Fas en homocigosis son extremadamente agresivas y dan lugar a una forma de ALPS denominada tipo 0 (Le Deist 1996). El ALPS tipo Ib se debe a defectos en Fas ligando (gen *TNFSF6*), y también puede ser producido por mutaciones en homo (Del-Rey 2006) o en heterocigosis (Wu 1996, Bi 2007). En algunos pacientes solo se detectan mutaciones en Fas en linfocitos T DN, ya que la mutación tiene un origen somático en un clon de células progenitoras que supone una ventaja selectiva frente a las células normales (Holzelova 2004). El ALPS tipo II se debe a mutaciones en Caspasa-8 (Chun 2002) o en Caspasa-10 (Wang 1999, Zhu 2006). Recientemente se ha descrito un caso debido a una mutación activadora en el gen *NRAS* que afecta a la vía intrínseca de la apoptosis (Oliveira 2007, ALPS tipo IV?). Existen muy pocos casos reportados de ALPS debido a mutaciones en cualquiera de los genes distintos de *FAS* recién mencionados. Los pacientes que cumplen todos los criterios diagnósticos de la enfermedad pero no se encuentra ninguna mutación en los genes conocidos de la vía de la apoptosis se engloban en el ALPS tipo III (aproximadamente un 20%).

No existe correlación entre el genotipo y la presentación clínica en cada uno de los pacientes debido a que las mutaciones en heterocigosis tienen una penetrancia clínica y una expresión en el fenotipo muy variables. Los familiares de los pacientes con ALPS, y que además son portadores de la mutación, pueden presentar todos los criterios de ALPS, o bien tener una clínica muy leve, e incluso ser totalmente asintomáticos (aunque la mayoría presenta linfocitos T doble negativos). Tampoco es fácil correlacionar algunos parámetros inmunológicos, como el número de células T doble negativas o la resistencia a la apoptosis mediada por Fas, con la expresión clínica de la enfermedad.

Por todo lo anterior, en todos los pacientes se comenzó por un análisis del gen que codifica para Fas (*TNFRSF6*), que luego se amplió a sus familiares directos. Puesto que la mayoría de las mutaciones se encuentran en el dominio muerte, codificado por

el exón 9 (el efecto dominante negativo se discute en el apartado 7.2.2.3 del Capítulo I), se comenzó el análisis por este exón. Se amplificó el exón 9 a partir de DNA genómico y el producto se analizó mediante secuenciación.

En el paciente de la familia A (III1), en su padre (II2), y en la abuela paterna (I1) se encontró un cambio en un nucleótido (T277C) que comporta el cambio de la leucina 226 por prolina (L226P), Figura IV.39 A. El cambio se encuentra en la región de la α hélice que forma parte del dominio muerte. Se ha reportado que las prolinas pueden distorsionar la estructura secundaria, especialmente las hélices α , por lo que probablemente la mutación altere en forma significativa la conformación del dominio muerte.

En el paciente de la familia C (II2), en su madre (I1) y en una muestra de bazo perteneciente a su hermana fallecida (II1), se encontró una inserción de una T en la posición 648 (Figura IV.39 B), de forma que se produce un corrimiento de la pauta de lectura en el codón 216 que codifica para tirosina (Y216fs) y la aparición de un codón de terminación en la posición 229 (X229), que hace que el dominio muerte quede precozmente truncado. Ninguna de las dos mutaciones ha sido reportada anteriormente, por lo que fueron remitidas a la base de datos *EMBL Nucleotide Sequence Database* (Nº acceso FM246458 y FM246459).

El análisis de los miembros de la familia D, como puede observarse en la Figura IV.39 C, permitió identificar una sustitución de una C por una T en la posición 942, que produce el cambio del codón 234, que codifica para una arginina, a un codón de terminación (R234X).

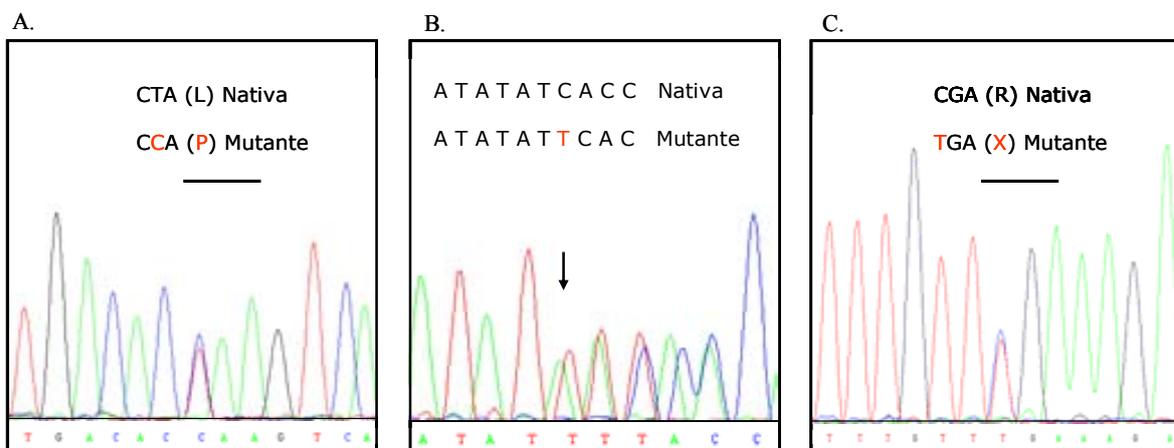


Figura IV.39: Análisis por secuenciación del exón 9 de Fas. Se analizó el exón 9 de Fas mediante amplificación de dicho exón con *primers* genómicos y posteriormente se secuenció el producto resultante. A: paciente III1, familia A. B: paciente II1, familia C. C: paciente IV.7, familia D.

RESULTADOS

En este caso la afectación del dominio muerte también se explicaría por la falta de un fragmento de dicho dominio debido a la terminación prematura de la proteína. Esta mutación había sido reportada con anterioridad, y dicho codón representa un *hot-spot* mutacional.

La mutación elimina la diana de restricción para TaqI, de forma que en los individuos portadores solo se observa un alelo digerido. Se investigó la presencia de la mutación en el resto de los individuos de la familia D (Figura IV.40) mediante el análisis de los fragmentos de digestión con TaqI de la amplificación del exón 9. Los casos en que se encontró un patrón portador para la mutación (un alelo digerido y el otro no) posteriormente fueron confirmados mediante secuenciación.

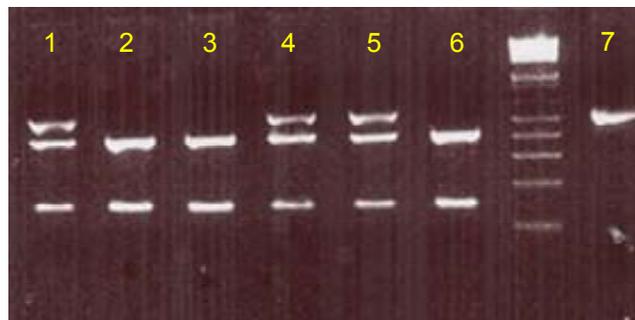


Figura IV.40: Análisis de la presencia de la mutación R234X en la familia D. El producto de amplificación del exón 9 de Fas se sometió a digestión con TaqI. La mutación elimina la diana de restricción de TaqI de forma que en los individuos con un alelo mutado (carriles 1, 4 y 5) se observa una banda del mismo peso molecular que la PCR sin digerir (carril 7). Los carriles 2 y 3 pertenecen a dos individuos de la misma familia no portadores de la mutación, mientras que el carril 6 corresponde a un individuo control.

En el paciente (II1) de la familia B no se encontró ninguna mutación en el exón 9 de Fas. Se procedió al análisis de toda la región codificante mediante retrotranscripción y amplificación del cDNA de *TNFRSF6*. En el exón 2 se encontró una sustitución de una G por una T en la posición 58 (Figura IV.41) que conlleva al cambio del ácido glutámico en la posición 20 a un codón de terminación (GAA, E → TAA, X). El cambio E20X no se ha reportado anteriormente, y supone la segunda mutación más precoz de todas las descritas, de manera que se puede afirmar que el alelo mutado no produciría una proteína.

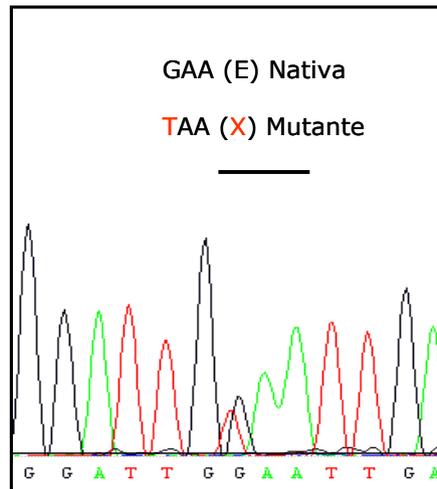


Figura IV.41: Análisis de la región codificante de Fas en el paciente B-III1. Se realizó una retrotranscripción a partir de RNA y se amplificó el cDNA. Posteriormente se analizó el producto de amplificación mediante secuenciación.

Se verificó la presencia de la mutación mediante amplificación del exón 2 a partir de DNA genómico y su posterior análisis por secuenciación. La nueva mutación se remitió a la base de datos al igual que las mutaciones detectadas en las familias A y C (*EMBL Nucleotide Sequence Database Accession N^o FM246457*).

En la paciente II1 de la familia E no se encontró ninguna mutación en el exón 9 de Fas, ni en ningún otro exón del gen. Por ello se procedió al análisis de la región codificante de FasL, pero tampoco se detectó ninguna mutación. Asimismo, se estudió el gen que codifica para Caspasa-10, otro componente de la vía de apoptosis dependiente de Fas y TRAIL, y cuyos defectos se asocian al ALPS tipo II. El análisis de la región codificante de Caspasa-10 reveló la presencia de un cambio V410I en heterocigosis. La mutación tiene una frecuencia cromosómica del 3,4 % en la población caucásica, y se la considera un polimorfismo, puesto que se ha encontrado en homocigosis en un individuo asintomático (Zhu 2006). En un trabajo previo, sin embargo, se detectó el genotipo V410I en homocigosis en un paciente con un cuadro de ALPS bastante severo que se diagnosticó como ALPS tipo II (Wang 1999), aunque dicho resultado se encuentra en discusión. De todas formas el cambio V410I en heterocigosis, ya sea tratándose de un polimorfismo o de una mutación, no ejercería ningún efecto en la función de la proteína.

3.3.4.1 Estudio de genes moduladores de ALPS

En los casos de ALPS con afectación del dominio muerte debido a mutaciones en el exón 9 de Fas el efecto dominante negativo está bien establecido. Cuando uno de los alelos se encuentra afectado, la probabilidad de que los 3 componentes del trímero (necesario para que se genere un dominio muerte DD funcional) sean normales disminuye drásticamente. Sin embargo, la penetrancia de la enfermedad en individuos portadores de una misma mutación es variable, indicando que probablemente existan otros genes moduladores de la enfermedad. Cuando la mutación en Fas genera un codón de terminación muy prematuro (como por ejemplo en la familia B), el mecanismo patogénico más probable parece ser un efecto de haploinsuficiencia (Roesler 2005). En este caso la participación de otros genes en la manifestación de la enfermedad parece aún más evidente, ya que es poco probable que el cuadro de ALPS se deba exclusivamente a una menor cantidad de la proteína Fas.

Se ha reportado que un polimorfismo en el promotor de la Caspasa-8 (delección de 6 nucleótidos, 6Ndel) se asocia, en homocigosis, a una menor producción de la proteína (Sun 2007). La frecuencia alélica del polimorfismo 6Ndel es del 25%, mientras que la variante alélica asociada a una mayor producción de Caspasa-8 (6Nins) tiene una frecuencia alélica del 75%. La Caspasa-8 es un componente importante de la vía de apoptosis, por lo que bajos niveles de la misma podrían ser un factor modulador positivo de ALPS. Para estudiar el polimorfismo del promotor de la Caspasa-8 en los pacientes con ALPS y en sus familiares directos, se realizó una amplificación (a partir de DNA genómico) de la región del promotor con los *primers* P-Casp-8-F y P-Casp-8-R, y se analizó el producto de PCR mediante secuenciación.

Los pacientes A-III1, C-II1, y cuatro miembros de la familia D, son homocigotos para el polimorfismo más frecuente, 6Nins, asociado con mayor producción de Caspasa-8, mientras que la mayoría de los pacientes de la familia D son heterocigotos (6Nins/6Ndel) (Tabla IV.8). Puesto que ninguno de ambos genotipos está asociado a una baja producción de Caspasa-8, es probable que en estos pacientes intervengan otros factores moduladores de ALPS.

Por el contrario, los pacientes B-II1 y D-IV7 presentan la variante 6Ndel (asociada a baja producción de Caspasa-8) en homocigosis. En el primer caso, como se mencionó anteriormente, es probable que la enfermedad se manifieste debido a un efecto de haploinsuficiencia, de forma que la combinación de bajos niveles de Fas y Caspasa-8 podría justificar el cuadro severo de ALPS que padece.

Por otra parte, el paciente D-IV7 presenta un número de linfocitos T DN y niveles de IL-10 más elevados que sus hermanos (D-IV8 y D-IV9) que tienen el genotipo 6Nins/6Ndel. En este caso las diferencias en los niveles de Caspasa-8 podrían explicar la variabilidad en la penetrancia de la enfermedad que se observa entre el paciente y sus hermanos.

Tabla IV.8: Análisis del polimorfismo del promotor de la Caspasa-8 en los pacientes con ALPS y en sus familiares directos.

Paciente	Polimorfismo en el promotor de caspasa-8		
	6Nins/6Nins	6Nins/6Ndel	6Ndel/6Ndel
A-III1	✓		
A-II2		✓	
B-III1			✓
C-II1	✓		
C-I1		✓	
D-IV1	✓		
D-IV2	✓		
D-IV3	✓		
D-IV4		✓	
D-IV5	✓		
D-IV6		✓	
D-V2		✓	
D-IV7			✓
D-IV8		✓	
D-IV9		✓	
D-V4		✓	
D-V5		✓	
E-II1	✓		
E-I1		✓	
E-I2	✓		
F-II1			✓
F-II2		✓	

También se encontró el genotipo 6Ndel/6Ndel en una paciente con ALPS (portadora de una mutación en el dominio muerte de Fas) que se había estudiado previamente en nuestro laboratorio (F-II1, Tabla IV.8), y que presentaba tanto una

RESULTADOS

clínica muy marcada como signos característicos de ALPS (un número muy elevado de linfocitos T DN (40 %), hipergammaglobulinemia pronunciada con marcado aumento de la IgE, y niveles elevados de IL-10). La ausencia de manifestaciones clínicas en el padre de la paciente (F-I1), portador de la mutación en Fas pero heterocigoto para el polimorfismo del promotor de la Caspasa-8, podría deberse a la presencia de niveles normales de Caspasa-8 (en contraposición a los bajos niveles en su hija).

Otro gen candidato a ejercer un efecto modulador positivo del ALPS es el que codifica para la Caspasa-10. Existen muy pocos casos de ALPS directamente asociados a un defecto en la actividad de esta proteína (ALPS II)(Wang 1999, Zhu 2006), habiéndose identificado dos mutaciones con efecto dominante negativo (L285F y I406L). La relación de otras mutaciones puntuales con la enfermedad es más dudosa. Por ejemplo, el cambio Y410I que presenta la paciente E-II1 y que, como se mencionó anteriormente, se ha detectado en homocigosis en un paciente con ALPS (Wang 1999), más tarde fue descrito por los mismos autores (Zhu 2006) como un polimorfismo, al detectarse en un individuo sano homocigoto para la mutación y encontrarse una frecuencia alélicas del 3,4% en la población caucásica. De hecho, en este último trabajo los autores proponen que el cambio Y410I tendría un efecto protector en individuos con ALPS Ia. El cambio Y446C también es controvertido, ya que posee una frecuencia cromosómica del 1,6% en la población caucásica, pero también se ha detectado en heterocigosis en un individuo con una forma leve de ALPS (Zhu 2006). Para intentar esclarecer el efecto de estas mutaciones y/o polimorfismos en el ALPS, se estudió el exón 9 de la Caspasa-10 (dentro del cual se encuentra la mayoría de los polimorfismos descritos: I406L, Y410I y Y446C) en los pacientes con ALPS y sus familiares directos a partir de DNA genómico.

Tabla IV.9: Análisis de los polimorfismos en el exón 9 de la Caspasa-10 en los pacientes con ALPS y en sus familiares directos.

Polimorfismos en el exón 9 de Caspasa-10		
V410I	Y446C	C463G
B-II1	D-IV7	C-I2
E-II1	D-V4	D-V5
E-I2	D-IV6	

Como puede observarse en la Tabla IV.9, el polimorfismo V410I se detectó en el paciente B-II1 (portador de una mutación en el exón 2 de Fas), en la paciente E-II1 (sin

mutaciones detectadas en Fas ni en FasL) y en su padre (E-I2). El análisis de un posible efecto protector es difícil, en el primer caso por no disponer de muestras de los familiares y en el segundo caso debido a que el polimorfismo se detecta tanto en la paciente como en su padre totalmente asintomático.

El cambio Y446C se encontró en tres pacientes de la familia D. Los pacientes D-IV7 y D-V4, presentan manifestaciones marcadas de ALPS, lo cual sugiere que esta mutación podría tener un efecto modulador positivo de la enfermedad (aunque el paciente D-IV7 también presenta el polimorfismo en el promotor de Caspasa-8 asociado a baja producción de la proteína). Por otra parte, la presencia del cambio Y446C en el paciente D-IV6, con clínica moderada de ALPS, y la ausencia de dicho cambio en su hija (D-V2), portadora asintomática de la misma mutación en Fas, también apuntan a una posible participación del polimorfismo Y446C.

Asimismo, se detectó un nuevo polimorfismo (T1387G) que origina un cambio de aminoácido (C463G) en el exón 9 de Caspasa-10 en un individuo portador asintomático de una mutación en Fas (C-I2) y en uno de los pacientes de la familia D (D-V5).

Además de las caspasas, muchos otros genes podrían actuar como moduladores del ALPS, ya que la apoptosis de los linfocitos es una vía muy compleja en la que intervienen una multitud de factores, tanto activadores como inhibidores.

V. DISCUSIÓN

1. Deficiencia Familiar de CD8

1.1 Análisis comparativo de las manifestaciones clínicas

Los pacientes que se estudian en este trabajo presentan una ausencia total de CD8, tanto en linfocitos T como en células NKs. Ambos tienen, en homocigosis, la mutación puntual 331G>A en el gen *CD8A* que lleva a la sustitución de la glicina 111 por serina en la subunidad α del correceptor. Esta mutación fue reportada anteriormente (de la Calle-Martín 2001) en un hermano de una de las pacientes aquí estudiadas (Figura IV.1). Las dos familias pertenecen a la etnia gitana y en ambos casos los progenitores de las pacientes son consanguíneos, aunque entre las dos familias no existe relación. Los pacientes presentan síntomas de inmunodeficiencia moderada con predominio de infecciones recurrentes del tracto respiratorio (principalmente de origen bacteriano), con un grado de afectación variable. El paciente en el que se reportó originalmente la enfermedad falleció antes de que fuera posible realizar un trasplante de pulmón debido a una insuficiencia respiratoria severa, mientras que su hermana (Paciente A-II5) hasta el momento solo ha presentado infecciones moderadas del tracto respiratorio sin más complicaciones. La paciente B-III1 presenta una clínica intermedia (Mancebo 2008), habiendo padecido infecciones respiratorias en forma reiterada pero sin haber producido una insuficiencia respiratoria crónica severa. Las pruebas de laboratorio revelaron valores normales de inmunoglobulinas séricas (incluyendo las subclases de IgG) y de las subpoblaciones linfocitarias, excepto por la ausencia de CD8 en los linfocitos T y en las células NKs. Por otra parte, los pacientes presentaron altos títulos de anticuerpos contra numerosas infecciones víricas y otros patógenos (CMV, herpes zoster, herpes simplex, rubéola, EBV, toxoplasma, *Mycoplasma pneumoniae*).

1.2 Análisis de la función del correceptor a nivel periférico y a nivel central

El hecho de que los pacientes hayan estado en contacto con diversos virus y patógenos sin complicaciones inmediatas evidentes indicaría que su sistema inmune es aparentemente competente. Una posibilidad sería que los linfocitos T CD4⁺ y las células NKs compensen la “ausencia” o la “falta de respuesta” de las células T CD8 citotóxicas. Pero la hipótesis que se abordó en este trabajo es que, incluso en ausencia de CD8, aún existiría cierto grado de maduración tímica de linfocitos T de linaje citotóxico, y dichos linfocitos T (potencialmente CD8) serían funcionales a nivel periférico. Esta última posibilidad se ve reforzada por las siguientes observaciones:

Primero, los pacientes presentan un número elevado de linfocitos Tαβ CD4⁻CD8⁻ (DN). Además, esta población de células T DN tiene un fenotipo compatible con linfocitos T efectoros de memoria (CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CCR7⁻) o efectoros (CD27^{lo/-}CD28^{RA^{+/}}) del linaje citotóxico (Sallusto 2004). En concordancia con estos resultados, un elevado porcentaje de linfocitos Tαβ DN de ambos pacientes fue positivo para perforina, granzima A, y granzima B, las moléculas citolíticas representativas de las células T efectoras. Los linfocitos T *naive* representan un porcentaje muy bajo de los linfocitos CD3⁺DN en los dos pacientes (menor al 10 % en comparación a valores de referencia de aproximadamente un 40-50% de los linfocitos T CD8⁺).

Segundo, las células CD3⁺DN de los pacientes muestran actividad citotóxica contra células alogénicas, aunque en menor grado que las células CD3⁺CD8⁺ de los individuos control. La disminución en la citotoxicidad se observa en condiciones en las que las células efectoras no representan un exceso respecto de las células diana, indicando que en condiciones limitantes de células efectoras el correceptor jugaría un papel importante en la capacidad citotóxica.

Tercero, los pacientes son capaces de generar una respuesta específica de virus restringida para MHC-I. Este hecho queda evidenciado por la presencia de células CD3⁺DN que se marcan positivamente con tetrámeros de moléculas HLA-A2 unidos a un péptido específico de CMV.

El hecho de que exista respuesta citotóxica en los pacientes no concuerda con varios trabajos realizados en modelos murinos *knock outs* para *CD8* que postulan que, en ausencia del correceptor, la respuesta citotóxica contra aloantígenos y antígenos virales se encuentra severamente afectada (Fung-Leung 1991, Bachmann 1995). Los

estudios más recientes en ratones $CD8^{-/-}$ (Andrews 2008, Riddle 2008) muestran que sí existe respuesta citotóxica, aunque de menor intensidad y más tardía que en ratones normales. Es probable que la falta de concordancia se deba a limitaciones en la metodología aplicada en los primeros trabajos, como el uso de técnicas poco sensibles y tiempos de ensayo no adecuados al notable retraso que suele observarse en la respuesta citotóxica en los ratones $CD8^{-/-}$.

Por otra parte, el estudio de los pacientes parece indicar que el correceptor sí jugaría un papel importante en el proceso de maduración de los timocitos restringidos para MHC-I. En primer lugar, la población de células $CD3+DN$ de los pacientes se encuentra en bajo número si se compara con la población $CD3+CD8+$ de individuos control, y el análisis del fenotipo de esta población $CD3+DN$ muestra una notable disminución de células *naive* en comparación a la población $CD3+CD8+$ en controles sanos. Estos resultados, en combinación con el bajo número de TRECs que se observa en la población $CD3+DN$ de ambos pacientes, sugieren que un porcentaje muy pequeño de estas células (presumiblemente pertenecientes al linaje citotóxico) corresponden a células que han emigrado recientemente del timo (Hazenberg 2001), mientras que la mayoría probablemente proceden de una selección y expansión clonal a nivel periférico. Dicha expansión estaría sometida a la presión antigénica y actuaría sobre una población reducida de células T restringidas para MHC-I, lo que explicaría las alteraciones en el repertorio $V\beta$ de las células T DN. El predominio de células que ya han sufrido una expansión clonal en periferia dentro de la población T DN explicaría el hecho de que dicha población sea incapaz de proliferar adecuadamente en presencia de IL-2 exógena durante una respuesta alogénica.

Según los datos anteriores, la maduración de los timocitos restringidos para MHC-I, en humanos, dependería en gran medida de la presencia del correceptor. Los estudios en modelos murinos $CD8^{-/-}$ concuerdan con estos resultados, ya que muchos trabajos demuestran que la selección positiva de células $TCR\alpha\beta$ DN restringidas para MHC-I se ve muy afectada (Fung-Leung 1991 b, Nakayama 1994, Bachmann 1995, Andrews 2008). La menor eficiencia de este proceso de maduración, radicaría en el hecho de que, en ausencia del correceptor, muchos timocitos restringidos para MHC-I no alcanzarían el umbral de activación requerido por el proceso de selección positiva. Solamente aquellos timocitos que dispongan de un TCR con una elevada afinidad por el ligando serían capaces de superar el proceso de selección positiva (Goldrath 1997, Sebзда 1997, Andrews 2008). En concordancia con esta hipótesis, la población de

DISCUSIÓN

linfocitos T CD4-CD8- de uno de los pacientes deficientes en CD8 una tetrámeros HLA-A2 unidos a un péptido viral de CMV con mayor eficiencia que la población homóloga de un individuo control (MFI paciente= 13; MFI control 4,9).

En definitiva, los datos de los pacientes con deficiencia familiar de CD8 sugieren que el correceptor participaría principalmente aumentando la eficiencia del proceso de maduración de los timocitos del linaje citotóxico. Como consecuencia de la ausencia del correceptor, emigrarían del timo muy pocos linfocitos restringidos para HLA-I y potencialmente citotóxicos. El proceso de selección conducido por la presión antigénica sobre este número tan reducido de linfocitos T justificaría la práctica ausencia de células con fenotipo *naive* en la población de linfocitos T DN a nivel periférico, y la disminución en su diversidad en el repertorio de familias V β . Esta población de células T DN conservaría, sin embargo, su capacidad de reconocimiento de antígenos en el contexto de las moléculas MHC-I y gran parte de su actividad citotóxica durante una respuesta alogénica.

1.3 Estudio de la prevalencia de la mutación en la población general y en la población gitana española

La existencia de la misma mutación en *CD8A* en una nueva familia no relacionada con la original, pero que compartía los datos de consanguinidad y la pertenencia a la etnia gitana, nos llevó a investigar la incidencia de la mutación en esta población. De 82 individuos gitanos españoles analizados, uno era portador de la mutación, mientras que no se detectó la mutación en ninguno de los 100 individuos de la población control (no gitana). En otro estudio realizado en paralelo se analizaron 242 muestras pertenecientes a individuos gitanos españoles y nuevamente se detectó la mutación en heterocigosis en una de ellas, mientras que no se detectó la mutación en individuos no gitanos ni en gitanos no españoles (Mancebo 2008). El resultado conjunto de ambos estudios permite establecer una frecuencia cromosómica de 1/300. También se estudió el haplotipo de la región cercana al CD8 y se encontró que los individuos de las tres familias analizadas que tienen la mutación comparten el mismo haplotipo. Esta observación sumada al hecho de que la mutación parece restringida a individuos gitanos de la península ibérica, sugiere un efecto fundador de la mutación en dicha población.

1.4 Análisis estructural de la molécula mutante CD8 α^{Ser}

Para identificar el mecanismo por el cual el cambio Gly111>Ser conduce a la ausencia total de CD8 en los pacientes, se realizó un estudio más exhaustivo de la estructura de la glicoproteína mutante. Para abordar el estudio se diseñaron moléculas quiméricas en las que se adicionaron péptidos marcadores (*tags*), tanto al extremo amino como al carboxilo de la glicoproteína mutante, para poder detectar la quimera con anticuerpos dirigidos contra los *tags*. La primera construcción que se generó fue UCHL-CD8 α^{Ser} , que consiste en la adición de un péptido derivado de la molécula humana CD45RO al extremo amino (extracelular) de CD8 α^{Ser} .

El análisis de la expresión de CD8 α^{Ser} en células transfectadas con esta construcción permitió demostrar que la molécula mutante es capaz de expresarse en la superficie celular. La molécula quimérica UCHL-CD8 α^{Ser} puede detectarse con UCHL1, el anticuerpo dirigido contra el *tag*, pero no con ninguno de los anticuerpos dirigidos contra el dominio inmunoglobulina. Estos resultados indicarían que la falta de reconocimiento por los anticuerpos convencionales se debería a que la mutación Gly111>Ser alteraría principalmente la estructura del dominio inmunoglobulina (dominio *IgV-like*).

El estudio de la expresión de CD8 α^{Ser} en células transfectadas con UCHL-CD8 α^{Ser} de forma estable mostró que la molécula mutante se expresa en niveles algo inferiores a la molécula nativa. Asimismo, la expresión en la superficie celular va disminuyendo a medida que transcurren los días, a diferencia de lo que ocurre con la construcción nativa UCHL-CD8 α^{Gly} , cuya expresión es estable. Por lo tanto, la mutación Gly111>Ser no solo evita que la molécula mutante sea reconocida por los anticuerpos anti-CD8, sino que también afecta su biogénesis, disminuyendo la eficiencia de alguno de los pasos que atraviesa la glicoproteína hasta llegar a la superficie celular. Resultados similares se obtienen con la molécula CD8 α murina, Lyt-2. La molécula quimérica de la variante mutante UCHL-Lyt-2 Ser no es reconocida con anticuerpos anti-Lyt-2 pero sí se detecta en la superficie de las células transfectadas con el anticuerpo dirigido contra el *tag*. Por otra parte, también se registra una inestabilidad en la expresión de Lyt-2 Ser en la superficie celular. El aumento de la actividad de la maquinaria de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) como respuesta a la acumulación de la proteína anómala en su interior permitiría explicar la disminución progresiva de la expresión de la molécula mutante (Ron 2007).

DISCUSIÓN

El análisis bioquímico de las variantes nativa (Gly) y mutante (Ser) de la glicoproteína CD8 α en extractos de células transfectadas con las construcciones UCHL-CD8 α y CD8 α -V5, mostró que CD8 α ^{Ser} posee un peso molecular unos 5 KDa mayor que CD8 α ^{Gly}. Mediante diversas aproximaciones se ha demostrado que dicha diferencia de peso molecular se debe a una modificación postraducciona que sufre la glicoproteína mutante como resultado del cambio Gly111Ser. En un primer lugar se analizó el contexto en el que se encuentra la mutación Gly111Ser y se encontró que se genera una diana de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr-X) como consecuencia del cambio Gly111Ser. No todas las secuencias consenso conducen a la adición de un N-carbohidrato, pero en este caso se comprobó, mediante distintas estrategias, que efectivamente se añade un carbohidrato al residuo de asparagina de la diana generada por la mutación. Dichas estrategias consistieron en la eliminación del N-carbohidrato en distintas etapas y en la comprobación, mediante estudios bioquímicos, de la recuperación del peso molecular de CD8 α ^{Ser}. La primera opción fue someter los extractos celulares a digestión con endoglicosilasas, la segunda estrategia consistió en la inhibición del proceso de N-glicosidación mediante tratamiento con tunicamicina de las células transfectadas con CD8 α ^{Ser} y, por último, se eliminó la secuencia consenso de N-glicosilación (mediante mutagénesis dirigida Asn>Asp pero manteniendo la mutación original Gly>Ser) en las construcciones de CD8 α ^{Ser} con las que posteriormente se realizaron las transfecciones estables.

Muchas mutaciones puntuales ejercen su efecto patológico alterando la glicosilación de las proteínas mutantes. Se ha demostrado que las mutaciones que generan ganancias de N-glicosilación representan un porcentaje considerable (1,4 %) de las mutaciones puntuales patológicas que afectan a proteínas de secreción o de membrana (Vogt 2005). Por ello se estudió si, en el caso particular de CD8 α ^{Ser}, la eliminación de la diana de N-glicosilación podría conducir a la recuperación de la estructura de la molécula mutante. La afectación del dominio inmunoglobulina no depende de la adición del N-carbohidrato, según demuestran los estudios de transfección con construcciones de CD8 α ^{Ser-Asp} (en las cuales se ha eliminado la secuencia consenso de la N-glicosidasa por mutagénesis dirigida Asn-Asp), puesto que dicha molécula no se detecta en la superficie celular con anticuerpos dirigidos contra el dominio inmunoglobulina. Por lo tanto, la alteración estructural de CD8 α ^{Ser} parece estar asociada directamente a la mutación Gly111>Ser. Según evidencias previas (de la Calle-Martín 2001), la sustitución de la glicina 111 por cualquier otro aminoácido

produciría la pérdida de la conformación del dominio inmunoglobulina. La glicina en la posición análoga a la 111 en las subunidades α y β de CD8 (en el motivo consenso G-Y-Y-F-C) está conservada en todos los vertebrados, con la única excepción de la subunidad β de CD8 murino. Estudios de modelado molecular (J. Tormo, comunicación personal) sugieren que este residuo formaría parte de la región implicada en la dimerización de los dominios *IgV-like*.

El estudio bioquímico de la molécula mutante CD8 α^{Ser} demuestra que existe una alteración muy pronunciada del proceso de O-glicosilación. Mientras que la molécula nativa CD8 α^{Gly} se encuentra fundamentalmente en su forma madura O-glicosilada, ocurre justo lo inverso con CD8 α^{Ser} . Este hecho demuestra que gran parte de la proteína CD8 α^{Ser} no llega al complejo Golgi. Tanto en la molécula nativa como en la mutante, el proceso de O-glicosilación se ve desfavorecido en la construcción CD8 α -V5 respecto de UCHL-CD8 α . Una explicación plausible es que el epítipo V5 interfiera con el transporte RE-Golgi anulando una señal de exportación, ya que se ha demostrado que la valina carboxiterminal de CD8 α actúa como señal de reconocimiento para el sistema de transporte RE-Golgi (Iodice 2001). De hecho, la proporción de la proteína sin O-glicosilación que se observa en la variante nativa (Gly111) de CD8 α pero sin el último residuo de valina (Iodice 2001), es la misma que la que se observa con la construcción CD8 α^{Gly} -V5. La eficiencia del proceso de O-glicosilación en la molécula mutante CD8 α^{Ser} no aumenta cuando se elimina la N-glicosilación, lo cual refuerza la hipótesis de que la causa de la alteración de la estructura de CD8 α^{Ser} se debe a la mutación Gly111Ser. De esta forma, el agregado del N-carbohidrato sería responsable del aumento del peso molecular que se observa en la glicoproteína mutante CD8 α^{Ser} , pero no estaría relacionado con la alteración estructural que sufre la molécula.

Las proteínas con una conformación anómala, ya sea de su estructura terciaria o cuaternaria, son excluidas de la vía de secreción por el sistema ERAD (degradación asociada al RE) y devueltas al citoplasma para su posterior degradación (Ellgard 2003, Kostova 2003). Varios resultados sugieren que, en el caso de CD8 α^{Ser} , la causa fundamental de su retención en el RE obedece a una alteración en su capacidad de dimerización. En primer lugar, no es posible detectar la forma homodimérica de CD8 α^{Ser} mediante estudios bioquímicos en condiciones no reductoras, a diferencia de lo que ocurre en la molécula nativa CD8 α^{Gly} . En segundo lugar y como demuestran los experimentos de cotransfección, CD8 α^{Ser} no forma heterodímeros con la cadena β del

DISCUSIÓN

correceptor, fenómeno que se produce con alta eficiencia en el caso de $CD8\alpha^{Gly}$. Por último, la mutación Gly>Ser en la glicoproteína monomérica CD7 no tiene ningún impacto en la estabilidad de su expresión en la superficie celular. Al igual que $CD8\alpha$, la glicoproteína CD7 presenta la secuencia consenso G-T-Y-T-C en su dominio *IgV-like* y, aunque se expresa en la superficie celular como monómero, presenta una alta homología a $CD8\alpha$. Por lo tanto, el hecho de que la biogénesis de $CD7^{Ser}$ no se vea afectada, sugiere que el fuerte impacto de la mutación puntual Gly>Ser en la glicoproteína $CD8\alpha$ se debe a que altera su capacidad de homo y hetero dimerización.

Si bien la N-glicosilación no parece tener una relación determinante con la alteración conformacional y la biogénesis de $CD8\alpha^{Ser}$, la interrupción de los pasos de modificación de los carbohidratos unidos a asparagina sí puede tener una gran implicación en los procesos que regulan la ruta intracelular de las glicoproteínas de secreción y de membrana. Esto se debe a que los N-carbohidratos modificados actúan como señales de acceso para diversos mecanismos que regulan el plegamiento y el control de calidad de las glicoproteínas en el RE (Helenius 2001, Hebert 2005, Ellgard 2003). La eliminación de una de las manosas terminales de los N-carbohidratos por la ER manosidasa I (ERM-I) es una señal de reconocimiento fundamental de ERAD, de forma que la ERM-I actuaría como un “marcador de tiempo” indicando que ha finalizado el plazo de conseguir un plegamiento correcto para la glicoproteína en cuestión (Termine 2009, Cabral 2001, Hebert 2005, Helenius 2004). Específicamente, se ha demostrado en este trabajo que el tratamiento con ciertas drogas modificadoras de la N-glicosilación (especialmente con el inhibidor de la ERM-I, Kifunensine) producen un aumento sustancial de los niveles de expresión de la glicoproteína mutante en la superficie de las células transfectadas con $CD8\alpha^{Ser}$. Asimismo, se favorece la formación de la forma madura O-glicosilada de la proteína, como demuestran los estudios bioquímicos en extractos de células transfectadas con $CD8\alpha^{Ser}$ y tratadas con Kifunensine. Algunos trabajos recientes han reportado una recuperación de la expresión y la función de proteínas mal plegadas tras el tratamiento con modificadores de la N-glicosilación (Vogt 2008, Bartoli 2008). En el caso de CD8, sin embargo, la recuperación de la expresión en la superficie celular probablemente no conduciría a la recuperación de la función como correceptor, ya que los experimentos bioquímicos con extractos de células transfectadas con $CD8\alpha^{Ser}$ y tratadas con Kifunensine muestran solo un aumento moderado de la forma dimérica de $CD8\alpha^{Ser}$ respecto de lo que ocurre en las células sin tratamiento. El correceptor se expresa en la

superficie de los linfocitos T como heterodímero CD8 $\alpha\beta$ o como homodímero CD8 $\alpha\alpha$, aunque en el caso del homodímero la función parece ser totalmente diferente (Cheroutre 2008). Es posible que la molécula mutante CD8 α^{Ser} pueda ejercer alguna función similar a la desempeñada por CD8 $\alpha\alpha$, pero no por CD8 $\alpha\beta$, que debido a su capacidad de integrarse en los balsas lipídicas es 100 veces más potente que el homodímero (Pang 2007).

Otro mecanismo de control de calidad del RE (además del que depende de los N-carbohidratos que acaba de describirse) está mediado por proteínas de la familia de las PDI (protein disulfuro isomerasa), que reconocen grupos sulfidrilo libres en proteínas que son incapaces de formar dímeros u oligómeros (Anelli 2003). Este mecanismo podría ser el responsable de que la molécula doble mutante CD8 $\alpha^{Ser-Asp}$ (en la cual se ha destruido la diana de N-glicosilación introducida por el cambio Gly>Ser) también sea retenida en el RE en su mayor parte, como demuestra la falta de O-glicosilación en los experimentos bioquímicos.

En conjunto, los resultados del análisis bioquímico de CD8 α^{Ser} permiten deducir el mecanismo por el cual el cambio Gly111Ser tiene un impacto tan fuerte en la expresión de la molécula mutante en la membrana celular. La mutación altera la estructura del dominio inmunoglobulina de CD8 α^{Ser} y, como consecuencia, su capacidad para formar dímeros. Asimismo, la mutación introduce un sitio de N-glicosilación, que si bien no es responsable directo de la alteración estructural, es el principal mecanismo por el cual el RE reconoce a la proteína como “defectuosa”. Una porción de la proteína mutante, sin embargo, consigue evadir el mecanismo de control de calidad y es transportada al Golgi (dónde es O-glicosilada) y posteriormente a la membrana celular. En gran parte, esto se debe a que la molécula posee una señal de reconocimiento para el transporte RE-Golgi en la cola citoplasmática (valina terminal), que compite con la maquinaria de control de calidad (Iodice 2001, Kinkaid 2006). Puesto que el tratamiento con inhibidores de la ERM-I (principal integrante de la vía de control de calidad dependiente de N-carbohidratos) aumenta substancialmente la expresión en la membrana de la forma madura (O-glicosilada) de la molécula mutante, existe la posibilidad de una futura aplicación terapéutica de los inhibidores de glucosidasas en el tratamiento de enfermedades causadas por mutaciones puntuales, que supongan una retención de estas moléculas en el RE durante su tránsito intracelular.

2. Otras inmunodeficiencias que afectan al eje de las células citotóxicas.

2.1 Deficiencia de HLA-I

La paciente con deficiencia de HLA-I que se estudia en este trabajo presenta una clínica muy similar a los pacientes con deficiencia de CD8. Desde la pubertad comenzó a desarrollar infecciones senobronquiales recurrentes de origen bacteriano que evolucionaron a bronquiectasias. Sin embargo, el fenotipo linfocitario de la paciente era normal, lo que permitía descartar una deficiencia de CD8. Por otra parte, las úlceras en la pierna de la paciente con evolución a granuloma necrotizante de la dermis y la epidermis sugerían, junto con las infecciones recurrentes del tracto respiratorio, una deficiencia en HLA-I. Dicha deficiencia fue confirmada mediante análisis de los niveles de expresión de las moléculas HLA de clase I en linfocitos y en monocitos, observándose en la paciente niveles de expresión 30 veces inferiores respecto de la media de individuos control. Asimismo, mediante análisis genético se detectó un cambio en homocigosis en el codón CGA 210 del gen TAP2, que codifica para una arginina (R), por un codón de terminación TGA (X). Esta mutación no ha sido descrita previamente, pero al igual que el resto de las mutaciones reportadas en los genes TAP, introduce un codón de terminación prematuro, y está asociada a un haplotipo HLA determinado.

Llama la atención que ni la deficiencia de CD8 ni la deficiencia de HLA-I conduzcan a una clara susceptibilidad a desarrollar infecciones virales en estos pacientes. Puesto que ambas inmunodeficiencias afectan la etapa de presentación de péptidos a los linfocitos CD8+, es probable que compartan un modelo de patología. La protección contra las infecciones virales severas estaría mediada, en parte, por linfocitos T CD4+, anticuerpos y células NKs. Sin embargo, en ambos casos sería posible la intervención de linfocitos citotóxicos restringidos para MHC-I específicos de virus. Hemos visto que en ausencia de CD8 existe un número, aunque limitado, de linfocitos T CD3+CD4-CD8- restringidos para las moléculas de HLA-I y capaces de reconocer un epítipo viral determinado. En el caso de los pacientes con defectos en TAP los mecanismos de presentación de péptidos independientes de TAP (Johnston and Del Val 2007) permitirían la generación de algunos linfocitos citotóxicos con especificidad para dichos péptidos (de la Salle 2002). En ambas inmunodeficiencias, sin embargo, el

número de linfocitos citotóxicos restringidos para MHC-I y específicos de virus estaría considerablemente disminuido, de forma que la respuesta citotóxica se produciría con retraso. Como consecuencia del aclaramiento viral retardado se produciría un aumento del reclutamiento de neutrófilos y mediadores inflamatorios. Puesto que el tracto respiratorio es muy susceptible al ataque de infecciones virales, sería el sitio donde se produciría un mayor daño tisular debido a la liberación de enzimas proteolíticas. La destrucción de las células ciliares y la fibrosis del tejido pulmonar aumentarían la susceptibilidad por infecciones bacterianas, retroalimentándose así el ciclo inflamatorio (Cerundolo 2006).

En cuanto a las lesiones granulomatosas que presenta la paciente (al igual que la mayoría de los pacientes con deficiencia de HLA-I), se ha reportado que uno de los mecanismos responsables podría ser la falta de inhibición de las células NKs en condiciones inflamatorias. La actividad citotóxica de las células NKs normalmente está controlada por un balance entre receptores activadores y receptores inhibidores, que reconocen moléculas HLA-I en la célula diana. El estudio de los modelos murinos de deficiencia de MHC-I (Liao 1991, Dorfman 1997) mostró que existe una “compensación a la baja” de las señales estimuladoras para favorecer la tolerancia. En humanos existiría un mecanismo de compensación similar, ya que las células NKs no estimuladas de pacientes deficientes en TAP tienen una actividad citolítica disminuida contra las células K562 deficientes en HLA-I (Zimmer 1998). Sin embargo, tras la activación *in vitro* con IL2, la capacidad de las células NKs TAP^{-/-} para lisar las células diana K562 es similar a la lisis producida por las células NKs de individuos control. En este sentido, las úlceras en la pierna de la paciente se desarrollaron como consecuencia de un traumatismo durante la infancia, que probablemente representó el estímulo inflamatorio desencadenante de la ruptura de la tolerancia. La paciente desarrolló un carcinoma epidermoide en la región previamente ulcerada, que posteriormente recidivó, desarrollando metástasis en hígado, pulmón y huesos, y conduciendo finalmente al fallecimiento de la paciente. Al tratarse de la primera vez que se describe una transformación neoplásica asociada a una deficiencia de HLA-I, este caso refuerza la importancia que tendrían los linfocitos T CD8+ y las células NKs en la defensa antitumoral.

2.2 Alteración en la función citotóxica.

2.2.1 Defectos en la vía de secreción de gránulos

Se estudiaron 2 pacientes con alteración en la vía de secreción de gránulos y albinismo parcial, indicando que en ambos casos la afectación involucra a componentes del mecanismo de secreción regulada de lisosomas modificados presentes tanto en las células citotóxicas como en los melanocitos. Sin embargo, el examen microscópico del cabello permitió distinguir diferencias en el patrón de distribución de gránulos de melanina entre ambos pacientes, sugiriendo que se trataba de alteraciones moleculares diferentes. En el paciente 1 se observaban acúmulos de gránulos de pigmentos de mayor tamaño y más heterogéneos que en el caso del paciente 2, típicos del Síndrome de Griscelli (GS)(Griscelli 1978). Asimismo, el examen microscópico del extendido de sangre periférica en el paciente 2 reveló la presencia de cuerpos de inclusión gigantes en granulocitos y linfocitos, un signo patognomónico del Síndrome de Chediak-Higashi (CHS)(Spritz 1998, Shiflett 2002, Ward 2002), que permitió diagnosticar al paciente. En el paciente 1 se confirmó, por análisis genético, un Síndrome de Griscelli tipo II. Se detectó la ausencia de los exones 3 y 4 en el transcrito maduro del gen *RAB27A*, lo cual conduciría a la pérdida de la pauta de lectura y a la aparición de un codón de terminación prematuro. Es probable que se trate del mismo defecto descrito previamente en 3 pacientes que, al igual que el paciente que se estudia en este trabajo, proceden del norte de África (Ménásche 2000). Sin embargo, debido a que los autores no estudiaron los extremos de la deleción a nivel genómico, no puede asegurarse que se trate del mismo defecto. En este trabajo se demuestra que la falta de los exones 3 y 4 se debe a una deleción en el gen *RAB27A* que abarca desde el nucleótido 2909 en el intrón 2 hasta el nucleótido 8476 en el intrón 4 (considerando como primer nucleótido a aquel que coincide con el inicio de transcripción). La aplicación práctica de la delimitación exacta de la deleción es la posibilidad de identificar a los individuos portadores sin la necesidad de requerir muestras de RNA, simplemente detectando la banda de amplificación con *primers* genómicos diseñados de forma que solo se obtiene una banda de 330 pb en los individuos portadores.

El GS tipo II y el CHS son inmunodeficiencias graves, ya que el Síndrome de Linfocitosis Hemofagocítica (HLH), que suele asociarse a infecciones por

herpes-virus, es de difícil tratamiento y muchas veces resulta letal. El HLH se produce en varias enfermedades que tienen en común una afectación del mecanismo citotóxico dependiente de la liberación de gránulos. La falta de depuración del antígeno en ausencia de actividad citolítica provocaría un aumento del tiempo de contacto entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno APC, que rescataría a las células activadas de la muerte celular inducida por activación (AICD) (Jordan 2004). Estos linfocitos T activados (principalmente CD8) producen grandes cantidades de IFN- γ y, por lo tanto, una activación de los macrófagos. A su vez los macrófagos producen TNF- α , IL-1, e IL-6, produciéndose un cuadro inflamatorio generalizado con daño tisular (Rosi 1998, Kagi 1999).

En ambos pacientes se estudió la función citotóxica de las células NKs y de los linfocitos T CD8+, encontrándose una deficiencia muy severa de ambas funciones. El hecho de que ambos pacientes hayan desarrollado uno (Paciente 2) o varios (Paciente 1) episodios de HLH (que se han logrado controlar farmacológicamente), pone en evidencia la importancia de la integridad del mecanismo de secreción de gránulos citotóxicos en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune.

El único tratamiento efectivo de la enfermedad es el trasplante precoz de médula ósea, y para ello es necesario que el diagnóstico se realice lo antes posible. Es importante destacar la utilidad del ensayo CD107a para determinar la capacidad de degranulación de las células NKs, que permite realizar una evaluación preliminar de forma rápida, sencilla y fiable, de la capacidad de las células NKs para secretar gránulos citotóxicos.

2.2.2 Defectos en la vía de apoptosis mediada por Fas

Además del mecanismo de liberación de gránulos citotóxicos, las CTLs utilizan otro mecanismo de citólisis que involucra la interacción entre Fas, expresado en la membrana de la célula diana, con FasL, cuya expresión en la membrana de la CTL se induce como consecuencia del reconocimiento del péptido. Sin embargo, esta vía parece tener mucha más importancia en el control de la homeostasis del sistema inmune que en la eliminación de células infectadas por virus o células tumorales.

En este trabajo se estudian diversos pacientes con Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS) bien caracterizados desde el punto de vista clínico. Asimismo, en todos los casos salvo en uno, se ha logrado identificar una mutación en el gen que

DISCUSIÓN

codifica para Fas, y tres de ellas no habían sido descritas previamente. En particular, el cambio E20X supone la segunda mutación más precoz de todas las descritas, de forma que a diferencia del resto de mutaciones, no ejercería un efecto dominante negativo. Todos los pacientes presentan los signos característicos del ALPS: esplenomegalia y/o linfadenopatías, expansión de linfocitos $T\alpha\beta$ CD4-CD8- y algún fenómeno autoinmune de manifestación hematológica (anemia, trombocitopenia, o neutropenia). Uno de los pacientes presentó una uveitis autoinmune, que también suele encontrarse en pacientes con ALPS, aunque con mucha menor frecuencia (Rieux-Laucat 2003, Sneller 2003).

La amplia serie de pacientes con ALPS que se estudia en este trabajo pone en evidencia una gran variabilidad clínica de la enfermedad, tanto entre individuos portadores de distintas mutaciones como entre aquellos que comparten una misma mutación. Es posible que el polimorfismo en el promotor de Caspasa-8 sea uno de los factores moduladores de la enfermedad, ya que uno de los pacientes con una mutación en la región extracelular de Fas presenta el polimorfismo 6Ndel, asociado a una baja producción de Caspasa-8, en homocigosis. Así, la combinación de bajos niveles tanto de Fas como de Caspasa-8 podría justificar la clínica de ALPS en este paciente. Asimismo, en otra paciente (no incluida en esta serie) que presenta un cuadro de ALPS muy marcado también se encontró el genotipo 6Ndel/6Ndel, mientras que su padre, portador de la mutación pero totalmente asintomático, es heterocigoto para el polimorfismo en el promotor de la Caspasa-8.

Otro gen candidato a ejercer un efecto modulador positivo del ALPS es el que codifica para la Caspasa-10. En este trabajo se estudiaron polimorfismos y/o mutaciones dentro del exón 9 del gen (I406L, Y410I y Y446C), que podrían tener una implicación en el ALPS. La presencia del cambio Y446C en un paciente con clínica moderada de ALPS, y la ausencia de dicho cambio en su hija, portadora asintomática de la misma mutación en FAS, sugieren una posible participación del polimorfismo Y446C en la enfermedad.

En todos los pacientes en los que se determinaron los niveles séricos de IL-10 se encontraron valores muy superiores al normal, y se observó una correlación positiva entre dichos valores y las manifestaciones clínicas de los pacientes. En el caso de la IgG sucedió algo similar, y también se observó, aunque solo en algunos casos, una correlación muy fuerte entre los niveles de IgE y la agresividad de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con varios trabajos recientes en los que se sugiere que los

niveles de linfocitos $T\alpha\beta$ CD4-CD8- en combinación con los valores séricos de IL-10 son una herramienta más útil que el ensayo de apoptosis *in vitro*, puesto que un resultado positivo en esta prueba no necesariamente está asociado a la enfermedad, como se observa en muchos familiares directos de los pacientes (Magerus-Chatinet 2009).

En definitiva, se han estudiado enfermedades que afectan a dos mecanismos de la fase eferente del sistema inmune: la liberación de gránulos citotóxicos y la vía de apoptosis mediada por Fas. Ambos parecen ser fundamentales para mantener la homeostasis, pero a través de diferentes mecanismos: la deficiencia de Fas causa una enfermedad linfoproliferativa autoinmune crónica, mientras que la pérdida de la capacidad para secretar gránulos citotóxicos conduce a una desregulación aguda y severa del sistema inmune (HLH) que casi siempre resulta letal.

VI. CONCLUSIONES

1. La generación de linfocitos T del linaje citotóxico se encuentra severamente afectada en ausencia de CD8, según demuestra la escasa representación de linfocitos *naïve*, el bajo número de TRECs, y la alteración en el repertorio V β en la población de linfocitos T $\alpha\beta$ CD4-CD8- de los pacientes con Deficiencia Familiar de CD8.
2. La población de linfocitos T $\alpha\beta$ CD4-CD8- de los pacientes posee capacidad citotóxica durante una respuesta alogénica y un porcentaje de células capaces de reconocer un antígeno viral en el contexto de las moléculas de HLA-I, indicando que el correceptor CD8 no es imprescindible para la función efectora de los linfocitos citotóxicos, para su selección positiva, ni para la unión de sus TCRs a HLA-I.
3. La mutación Gly111Ser se encuentra restringida a la población gitana de origen ibérico (frecuencia cromosómica 1/300), y parece tener un efecto fundador en dicha población.
4. La mutación Gly111Ser altera la estructura del dominio Ig, introduce una diana de N-glicosilación y afecta el proceso de O-glicosilación de CD8 α^{Ser} . Sin embargo, la eliminación del N-carbohidrato no conlleva la recuperación de la estructura del dominio inmunoglobulina ni la recuperación de la forma madura O-glicosilada, indicando que ambas alteraciones son consecuencia directa del cambio Gly111Ser.
5. CD8 α^{Ser} es incapaz de formar homodímeros o heterodímeros con CD8 β . Por otra parte, el cambio de glicina a serina en la glicoproteína monomérica CD7 no repercute en la capacidad de la molécula para expresarse en la membrana. La

CONCLUSIONES

combinación de ambos resultados sugiere que el fuerte impacto que ejerce la mutación en CD8 α^{Ser} se debe a que la molécula mutante no puede dimerizar.

6. La disrupción del procesamiento de los N-carbohidratos mediante el tratamiento con Kifunensine conduce a un aumento considerable de la expresión de CD8 α^{Ser} en la membrana celular y a un aumento de su forma madura O-glicosilada, sugiriendo que los inhibidores de glicosidasas podrían tener alguna aplicación terapéutica en enfermedades causadas por mutaciones puntuales.
7. Se describe una nueva mutación en TAP2 en una paciente con deficiencia de HLA-I. Es el primer caso en el que se describe una neoplasia secundaria a BLS-I, sugiriendo que la baja expresión de las moléculas HLA-I podría estar relacionada con el escape de las células tumorales de los linfocitos T CD8 citotóxicos y las células NKs.
8. Se detecta la falta de dos exones en la región codificante de RAB27A en un nuevo caso de Síndrome de Griscelli tipo II y se delimitan los extremos de la deleción a nivel genómico, simplificándose la detección de portadores.
9. Se describen tres nuevas mutaciones en el gen que codifica para Fas. La amplia serie de pacientes con ALPS que se describe revela una gran variabilidad clínica de la enfermedad, tanto entre individuos portadores de distintas mutaciones como entre aquellos que pertenecen a una misma familia.

ABREVIATURAS

A

A	Adenina
ADA	Adenosín deaminasa
ADCC	Citotoxicidad dependiente de anticuerpo
AICD	Muerte celular inducida por activación
AID	Citidín deaminasa inducida por activación
AINR	Falta de respuesta inducida por activación
AIRE	Regulador autoinmune
ALPS	Síndrome linfoproliferativo autoinmune
APC	Célula presentadora de antígeno
APECED	Poliendocrinopatía autoinmune y displasia ectodérmica
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspártico
ATP	Adenosín trifosfato

B

BCR	Receptor del linfocito B
BSA	Albúmina sérica bobina
BTK	Tirosín kinasa de Bruton

C

C	Citosina
CIITA	Transactivador del complejo principal de histocompatibilidad de tipo II
CD	Cluster de diferenciación
CD40L	Ligando de CD40
CDR	Región determinante de la complementariedad
CHS	Síndrome de Chediak-Higashi
cls	Células
ConA	Concanavalina A
⁵¹ Cr	Isótopo 51 del Cromo
CMV	Citomegalovirus
cpm	Cuentas por minuto
CTL	Linfocito T citotóxico
Cys	Cisteína

D

DD	Dominio muerte
----	----------------

ABREVIATURAS

DISC	Complejo señalizador inductor de muerte
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DN	Doble negativa
DNA	Acido desoxirribonucleico (ADN)
dNTPs	2'Desoxirribonucleósidos-5'trifosfato
DTT	Ditiotreitol (agente reductor)

E

EBV	Virus de Epstein-Barr
ECD	Tandem de fluorocromos Ficoeritrina-Texas red (PETR)
EDTA	Acido etilen-diamino-tetraacético
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplasmático

F

FADD	Dominio muerte asociado a Fas
FCS	Suero fetal bobino
FHL	Linfocitosis Hemofagocítica Familiar
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxp3	Regulador transcripcional de la familia forkhead/winged-helix

G

G	Guanina
GlcNAc	N-Acetil-glucosamina
Gly	Glicina

H

HLA	Antígeno leucocitario humano
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLH	Linfocitosis Hemofagocítica
HRP	Peroxidasa de rábano

I

IDP	Inmunodeficiencia primaria
Ig	Inmunoglobulina
IgV-like	Dominio con similitud a los dominios Ig tipo variable
IEL	Linfocitos intraepiteliales
IFN	Interferón
IL-	Interleuquina
IP3	Inositol trifosfato
IPEX	Inmunodeficiencia/desregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al cromosoma X

ITAM Motivo de activación del inmunorreceptor por tirosina
 ITIM Motivo de inhibición del inmunorreceptor por tirosina

K

Kb Kilobase
 KDa Kilodaltons

L

LCL Línea celular linfoide

M

Mb Megabase
 MFI Intensidad de fluorescencia media
 MHC Complejo principal de histocompatibilidad
 MO Médula ósea
 MTOC Centro organizador de microtúbulos

N

NB-DNJ N-butyldeoxynojirimycin
 NEMO Gen modulador esencial de NF-kB
 NK Célula Natural Killer

O

O/N Incubación de más de 8 horas (Over Night)

P

Pb Pares de bases
 PBMC Célula mononuclear de sangre periférica
 PMSF Fluoruro de fenilmetanosulfonilo (inhibidor de fosfatasas)
 PBS Solución de tampón fosfato
 PCR Reacción en cadena de la polimerasa
 PDI Protein Disulfuro Isomerasa
 PE Ficoeritrina
 PC5 Tandem de fluorocromos Ficoeritrina-Cianina 5 (PECy5)
 PHA Fitohemaglutinina (mitógeno de linfocitos T)
 PWM Pokeweed Mitogen (mitógeno de linfocitos T y B)

R

R Arginina
 RAG Gen activador de la recombinación
 RNA Acido ribonucleico

ABREVIATURAS

r.p.m Revoluciones por minuto
RE Retículo endoplásmico

S

Ser Serina
SCI Suero de conejo inactivado
SCID Inmunodeficiencia Severa Combinada
SDS Dodecil-sulfato sódico
SG Síndrome de Griscelli
SP Simple positivo

T

T Timina
TA Temperatura ambiente
TAP Transportador asociado al procesamiento del antígeno
TBS Solución de tampón Tris
TBST Solución de tampón Tris con Tween20
TCR Receptor de la célula T
TE Tris-EDTA
TLR Receptor *Toll-like*
TNF Factor de necrosis tumoral
TP Triple positivo
TRECs Círculos de escisión de los reordenamientos del TCR

U

U Unidad enzimática
UNG Uracil-N-glicosilasa
UPR Respuesta generada por la acumulación de proteínas con conformación anómala (*Unfolded protein response*)

W

WAS Síndrome de Wiscott Aldrich
WB Western Blot
WT Nativo

X

XLA Agamaglobulinemia ligada al cromosoma X
XLP Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDO	SIMBOLO	ABREVIATURA
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Acido Aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Acido Glutámico	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

BIBLIOGRAFÍA

- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. "Cellular and Molecular Immunology" 6th Edition. W.B. Saunders Company.
- ALPSbase: "Database of mutations causing human ALPS". <http://research.nhgri.nih.gov/ALPS/>.
- Aichele, P., H. Unsoeld, et al. (2006). "CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion." *J Immunol* 176(8): 4525-9.
- Aliahmad, P. and J. Kaye (2008). "Development of all CD4 T lineages requires nuclear factor TOX." *J Exp Med* 205(1): 245-56.
- Anderson, M. S., E. S. Venzani, et al. (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." *Science* 298(5597): 1395-401.
- Andrews, N. P., C. D. Pack, et al. (2008). "Generation of antiviral major histocompatibility complex class I-restricted T cells in the absence of CD8 coreceptors." *J Virol* 82(10): 4697-705.
- Anel, A., M. Buferne, et al. (1994). "T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A." *Eur J Immunol* 24(10): 2469-76.
- Anelli, T., M. Alessio, et al. (2003). "Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: the role of ERp44." *EMBO J* 22(19): 5015-22.
- Arcaro, A., C. Gregoire, et al. (2001). "CD8beta endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-associated CD8/p56(lck) complexes." *J Exp Med* 194(10): 1485-95.
- Arcaro, A., C. Gregoire, et al. (2000). "Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function." *J Immunol* 165(4): 2068-76.
- Bachmann, M. F., A. Oxenius, et al. (1995). "T cell development in CD8^{-/-} mice. Thymic positive selection is biased toward the helper phenotype." *J Immunol* 155(8): 3727-33.
- Bahadoran, P., E. Aberdam, et al. (2001). "Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes." *J Cell Biol* 152(4): 843-50.
- Balaji, K. N., N. Schaschke, et al. (2002). "Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation." *J Exp Med* 196(4): 493-503.
- Barbosa, M. D., Q. A. Nguyen, et al. (1996). "Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes." *Nature* 382(6588): 262-5.
- Barlowe, C. (2003). "Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out?" *Trends Cell Biol* 13(6): 295-300.
- Bartoli, M., E. Gicquel, et al. (2008). "Mannosidase I inhibition rescues the human alpha-sarcoglycan R77C recurrent mutation." *Hum Mol Genet* 17(9): 1214-21.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, et al. (1997). "Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help." *J Exp Med* 186(1): 65-70.

- Beresford, P. J., D. Zhang, et al. (2001). "Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks." *J Biol Chem* 276(46): 43285-93.
- Bi, L. L., G. Pan, et al. (2007). "Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib." *BMC Med Genet* 8: 41.
- Biassoni, R., C. Cantoni, et al. (2001). "Human natural killer cell receptors and co-receptors." *Immunol Rev* 181: 203-14.
- Biron, C. A., K. S. Byron, et al. (1989). "Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells." *N Engl J Med* 320(26): 1731-5.
- Bleesing, J. J., M. R. Brown, et al. (2001). "Immunophenotypic profiles in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Blood* 98(8): 2466-73.
- Bosque, A., I. Marzo, et al. (2007). "Apoptosis by IL-2 deprivation in human CD8+ T cell blasts predominates over death receptor ligation, requires Bim expression and is associated with Mcl-1 loss." *Mol Immunol* 44(6): 1446-53.
- Bosselut, R., L. Feigenbaum, et al. (2001). "Strength of signaling by CD4 and CD8 coreceptor tails determines the number but not the lineage direction of positively selected thymocytes." *Immunity* 14(4): 483-94.
- Bosselut, R., T. I. Guintier, et al. (2003). "Unraveling a revealing paradox: Why major histocompatibility complex I-signaled thymocytes "paradoxically" appear as CD4+8lo transitional cells during positive selection of CD8+ T cells." *J Exp Med* 197(12): 1709-19.
- Bosselut, R., S. Kubo, et al. (2000). "Role of CD8beta domains in CD8 coreceptor function: importance for MHC I binding, signaling, and positive selection of CD8+ T cells in the thymus." *Immunity* 12(4): 409-18.
- Bosselut, R., W. Zhang, et al. (1999). "Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction." *J Exp Med* 190(10): 1517-26.
- Brugnera, E., A. Bhandoola, et al. (2000). "Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells." *Immunity* 13(1): 59-71.
- Butcher, E. C. and L. J. Picker (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." *Science* 272(5258): 60-6.
- Butcher, E. C. and L. J. Picker (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." *Science* 272(5258): 60-6.
- Cabral, C. M., Y. Liu, et al. (2001). "Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway." *Trends Biochem Sci* 26(10): 619-24.
- Cantrell, D. A. (2002). "T-cell antigen receptor signal transduction." *Immunology* 105(4): 369-74.
- Carleton, M. and D. T. Brown (1997). "The formation of intramolecular disulfide bridges is required for induction of the Sindbis virus mutant ts23 phenotype." *J Virol* 71(10): 7696-703.
- Carter, L., L. A. Fouser, et al. (2002). "PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2." *Eur J Immunol* 32(3): 634-43.

- Cawthon, A. G. and M. A. Alexander-Miller (2002). "Optimal colocalization of TCR and CD8 as a novel mechanism for the control of functional avidity." *J Immunol* 169(7): 3492-8.
- Cawthon, A. G., H. Lu, et al. (2001). "Peptide requirement for CTL activation reflects the sensitivity to CD3 engagement: correlation with CD8alphabeta versus CD8alphaalpha expression." *J Immunol* 167(5): 2577-84.
- Cerundolo, V., J. Alexander, et al. (1990). "Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex." *Nature* 345(6274): 449-52.
- Chang, H. C., K. Tan, et al. (2005). "Structural and mutational analyses of a CD8alphabeta heterodimer and comparison with the CD8alphaalpha homodimer." *Immunity* 23(6): 661-71.
- Cheroutre, H. (2004). "Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells." *Annu Rev Immunol* 22: 217-46.
- Chi, T. H., M. Wan, et al. (2002). "Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes." *Nature* 418(6894): 195-9.
- Choi, Y., V. R. Ramnath, et al. (1999). "Expression in transgenic mice of dominant interfering Fas mutations: a model for human autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Clin Immunol* 93(1): 34-45.
- Chun, H. J., L. Zheng, et al. (2002). "Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency." *Nature* 419(6905): 395-9.
- Colucci, F., M. A. Caligiuri, et al. (2003). "What does it take to make a natural killer?" *Nat Rev Immunol* 3(5): 413-25.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* 22(11): 633-40.
- Crooks, M. E. and D. R. Littman (1994). "Disruption of T lymphocyte positive and negative selection in mice lacking the CD8 beta chain." *Immunity* 1(4): 277-85.
- Crozat, K., K. Hoebe, et al. (2007). "Jinx, an MCMV susceptibility phenotype caused by disruption of Unc13d: a mouse model of type 3 familial hemophagocytic lymphohistiocytosis." *J Exp Med* 204(4): 853-63.
- Curtsinger, J. M., D. C. Lins, et al. (2003). "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function." *J Exp Med* 197(9): 1141-51.
- Dave, V. P., D. Allman, et al. (1998). "HD mice: a novel mouse mutant with a specific defect in the generation of CD4(+) T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 8187-92.
- Day, C. L., D. E. Kaufmann, et al. (2006). "PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression." *Nature* 443(7109): 350-4.
- De la Calle-Martin, O., Casamitjana N. "CD8 Deficiency", *Encyclopedia of Molecular Diseases*, Ed. By Lang, Florian. 2009. ISBN: 978-3-540-67136-7.
- De la Calle-Martin, O., M. Hernandez, et al. (2001). "Familial CD8 deficiency due to a mutation in the CD8 alpha gene." *J Clin Invest* 108(1): 117-23.

- de la Salle, H., D. Hanau, et al. (1994). "Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency." *Science* 265(5169): 237-41.
- de la Salle, H., E. Houssaint, et al. (1997). "Human peptide transporter deficiency: importance of HLA-B in the presentation of TAP-independent EBV antigens." *J Immunol* 158(10): 4555-63.
- de la Salle, H., X. Saulquin, et al. (2002). "Asymptomatic deficiency in the peptide transporter associated to antigen processing (TAP)." *Clin Exp Immunol* 128(3): 525-31.
- de la Salle, H., J. Zimmer, et al. (1999). "HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1." *J Clin Invest* 103(5): R9-R13.
- Deeths, M. J., R. M. Kedl, et al. (1999). "CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation." *J Immunol* 163(1): 102-10.
- Deeths, M. J., R. M. Kedl, et al. (1999). "CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation." *J Immunol* 163(1): 102-10.
- Dell'Angelica, E. C., V. Shotelersuk, et al. (1999). "Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor." *Mol Cell* 3(1): 11-21.
- Del-Rey, M., J. Ruiz-Contreras, et al. (2006). "A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Blood* 108(4): 1306-12.
- Devine, L., L. J. Kieffer, et al. (2000). "Human CD8 beta, but not mouse CD8 beta, can be expressed in the absence of CD8 alpha as a beta beta homodimer." *J Immunol* 164(2): 833-8.
- Devine, L., J. Sun, et al. (1999). "Orientation of the Ig domains of CD8 alpha beta relative to MHC class I." *J Immunol* 162(2): 846-51.
- Dianzani, U., A. Chiochetti, et al. (2003). "Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity." *Life Sci* 72(25): 2803-24.
- Donato, L., H. de la Salle, et al. (1995). "Association of HLA class I antigen deficiency related to a TAP2 gene mutation with familial bronchiectasis." *J Pediatr* 127(6): 895-900.
- Dorfman, J. R., J. Zerrahn, et al. (1997). "The basis for self-tolerance of natural killer cells in beta2-microglobulin- and TAP-1- mice." *J Immunol* 159(11): 5219-25.
- Doucey, M. A., L. Goffin, et al. (2003). "CD3 delta establishes a functional link between the T cell receptor and CD8." *J Biol Chem* 278(5): 3257-64.
- D'Souza, M., A. P. Fontenot, et al. (2007). "Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction." *J Immunol* 179(3): 1979-87.
- Dufourcq-Lagelouse, R., E. Pastural, et al. (1999). "Genetic basis of hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome (Review)." *Int J Mol Med* 4(2): 127-33.
- Elbein, A. D. (1991). "Glycosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing." *FASEB J* 5(15): 3055-63.
- Elbein, A. D., J. E. Tropea, et al. (1990). "Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I." *J Biol Chem* 265(26): 15599-605.

- Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3): 181-91.
- Ellmeier, W., M. J. Sunshine, et al. (1998). "Multiple developmental stage-specific enhancers regulate CD8 expression in developing thymocytes and in thymus-independent T cells." *Immunity* 9(4): 485-96.
- Enders, A., B. Zieger, et al. (2006). "Lethal hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type II." *Blood* 108(1): 81-7.
- Erman, B., A. S. Alag, et al. (2006). "Coreceptor signal strength regulates positive selection but does not determine CD4/CD8 lineage choice in a physiologic in vivo model." *J Immunol* 177(10): 6613-25.
- Fan, Z., P. J. Beresford, et al. (2003). "Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A." *Nat Immunol* 4(2): 145-53.
- Feik, N., I. Bilic, et al. (2005). "Functional and molecular analysis of the double-positive stage-specific CD8 enhancer E8III during thymocyte development." *J Immunol* 174(3): 1513-24.
- Feldmann, J., I. Callebaut, et al. (2003). "Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3)." *Cell* 115(4): 461-73.
- Fernandez, N. C., E. Treiner, et al. (2005). "A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules." *Blood* 105(11): 4416-23.
- Fischer, A., N. Cerf-Bensussan, et al. (1986). "Allogeneic bone marrow transplantation for erythrophagocytic lymphohistiocytosis." *J Pediatr* 108(2): 267-70.
- Fisher, G. H., F. J. Rosenberg, et al. (1995). "Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Cell* 81(6): 935-46.
- Fung-Leung, W. P., T. M. Kundig, et al. (1994). "Reduced thymic maturation but normal effector function of CD8+ T cells in CD8 beta gene-targeted mice." *J Exp Med* 180(3): 959-67.
- Fung-Leung, W. P., T. M. Kundig, et al. (1991a). "Immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice without CD8 expression." *J Exp Med* 174(6): 1425-9.
- Fung-Leung, W. P., M. W. Schilham, et al. (1991b). "CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells." *Cell* 65(3): 443-9.
- Furukawa, H., S. Murata, et al. (1999). "Splice acceptor site mutation of the transporter associated with antigen processing-1 gene in human bare lymphocyte syndrome." *J Clin Invest* 103(5): 755-8.
- Fuss, I. J., W. Strober, et al. (1997). "Characteristic T helper 2 T cell cytokine abnormalities in autoimmune lymphoproliferative syndrome, a syndrome marked by defective apoptosis and humoral autoimmunity." *J Immunol* 158(4): 1912-8.
- Gadola, S. D., H. T. Moins-Teisserenc, et al. (2000). "TAP deficiency syndrome." *Clin Exp Immunol* 121(2): 173-8.
- Gangadharan, D. and H. Cheroutre (2004). "The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta." *Curr Opin Immunol* 16(3): 264-70.
- Gangadharan, D., F. Lambomez, et al. (2006). "Identification of pre- and postselection TCRalphabeta+ intraepithelial lymphocyte precursors in the thymus." *Immunity* 25(4): 631-41.

- Gao, G. F. and B. K. Jakobsen (2000). "Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor." *Immunol Today* 21(12): 630-6.
- Garefalaki, A., M. Coles, et al. (2002). "Variegated expression of CD8 alpha resulting from in situ deletion of regulatory sequences." *Immunity* 16(5): 635-47.
- Gasser, S. and D. H. Raulet (2006). "Activation and self-tolerance of natural killer cells." *Immunol Rev* 214: 130-42.
- Geha, R. S., L. D. Notarangelo, et al. (2007). "Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee." *J Allergy Clin Immunol* 120(4): 776-94.
- Goldrath, A. W., K. A. Hogquist, et al. (1997). "CD8 lineage commitment in the absence of CD8." *Immunity* 6(5): 633-42.
- Goping, I. S., M. Barry, et al. (2003). "Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition." *Immunity* 18(3): 355-65.
- Grande, A. G., 3rd, T. N. Golovina, et al. (2000). "Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in Tapasin mutant mice." *Immunity* 13(2): 213-22.
- Griscelli, C., A. Durandy, et al. (1978). "A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency." *Am J Med* 65(4): 691-702.
- Guidotti, L. G. and F. V. Chisari (2001). "Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response." *Annu Rev Immunol* 19: 65-91.
- Haddad, E. K., X. Wu, et al. (2001). "Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice." *J Cell Biol* 152(4): 835-42.
- Hayday, A. C. and D. J. Pennington (2007). "Key factors in the organized chaos of early T cell development." *Nat Immunol* 8(2): 137-44.
- Hazenberg, M. D., M. C. Verschuren, et al. (2001). "T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation." *J Mol Med* 79(11): 631-40.
- He, X., V. P. Dave, et al. (2005). "The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment." *Nature* 433(7028): 826-33.
- He, X., K. Park, et al. (2008). "CD4-CD8 lineage commitment is regulated by a silencer element at the ThPOK transcription-factor locus." *Immunity* 28(3): 346-58.
- Hebert, D. N., S. C. Garman, et al. (2005). "The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags." *Trends Cell Biol* 15(7): 364-70.
- Helenius, A. and M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." *Science* 291(5512): 2364-9.
- Helenius, A. and M. Aebi (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* 73: 1019-49.

- Henter, J. I., A. Horne, et al. (2007). "HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis." *Pediatr Blood Cancer* 48(2): 124-31.
- Hernandez-Hoyos, G., S. J. Sohn, et al. (2000). "Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment." *Immunity* 12(3): 313-22.
- Hokland, M. and P. J. Kuppen (2005). "Natural killer cells: from "disturbing" background to central players of immune responses." *Mol Immunol* 42(4): 381-3.
- Holcombe, R. F., W. Strauss, et al. (1987). "Relationship of the genes for Chediak-Higashi syndrome (beige) and the T-cell receptor gamma chain in mouse and man." *Genomics* 1(3): 287-91.
- Holler, P. D. and D. M. Kranz (2003). "Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation." *Immunity* 18(2): 255-64.
- Holt, O. J., F. Gallo, et al. (2006). "Regulating secretory lysosomes." *J Biochem* 140(1): 7-12.
- Holzelova, E., C. Vonarbourg, et al. (2004). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations." *N Engl J Med* 351(14): 1409-18.
- Hostert, A., M. Tolaini, et al. (1997). "A region in the CD8 gene locus that directs expression to the mature CD8 T cell subset in transgenic mice." *Immunity* 7(4): 525-36.
- Infante, A. J., H. A. Britton, et al. (1998). "The clinical spectrum in a large kindred with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a Fas mutation that impairs lymphocyte apoptosis." *J Pediatr* 133(5): 629-33.
- Iodice, L., S. Sarnataro, et al. (2001). "The carboxyl-terminal valine is required for transport of glycoprotein CD8 alpha from the endoplasmic reticulum to the intermediate compartment." *J Biol Chem* 276(31): 28920-6.
- Itano, A. and E. Robey (2000). "Highly efficient selection of CD4 and CD8 lineage thymocytes supports an instructive model of lineage commitment." *Immunity* 12(4): 383-9.
- Ito, T., R. Amakawa, et al. (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." *J Exp Med* 195(11): 1507-12.
- Jabado, N., E. R. de Graeff-Meeder, et al. (1997). "Treatment of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with bone marrow transplantation from HLA genetically nonidentical donors." *Blood* 90(12): 4743-8.
- Jackson, C. E., R. E. Fischer, et al. (1999). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance." *Am J Hum Genet* 64(4): 1002-14.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation." *Annu Rev Immunol* 10: 645-74.
- Jenkinson, S. R., A. M. Intlekofer, et al. (2007). "Expression of the transcription factor cKrox in peripheral CD8 T cells reveals substantial postthymic plasticity in CD4-CD8 lineage differentiation." *J Exp Med* 204(2): 267-72.
- Johnstone, C. and M. Del Val (2007). "Traffic of proteins and peptides across membranes for immunosurveillance by CD8(+) T lymphocytes: a topological challenge." *Traffic* 8(11): 1486-94.

- Jordan, M. B., D. Hildeman, et al. (2004). "An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder." *Blood* 104(3): 735-43.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, et al. (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." *Nat Immunol* 4(12): 1191-8.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, et al. (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." *Nat Immunol* 4(12): 1191-8.
- Kafrouni, M. I., G. R. Brown, et al. (2001). "Virally infected hepatocytes are resistant to perforin-dependent CTL effector mechanisms." *J Immunol* 167(3): 1566-74.
- Kagi, D., B. Ledermann, et al. (1994). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice." *Nature* 369(6475): 31-7.
- Kagi, D., B. Odermatt, et al. (1999). "Homeostatic regulation of CD8+ T cells by perforin." *Eur J Immunol* 29(10): 3262-72.
- Kam, C. M., D. Hudig, et al. (2000). "Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors." *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 307-23.
- Kappes, D. J. and X. He (2005). "CD4-CD8 lineage commitment: an inside view." *Nat Immunol* 6(8): 761-6.
- Kappes, D. J. and X. He (2006). "Role of the transcription factor Th-POK in CD4:CD8 lineage commitment." *Immunol Rev* 209: 237-52.
- Keefe, R., V. Dave, et al. (1999). "Regulation of lineage commitment distinct from positive selection." *Science* 286(5442): 1149-53.
- Keir, M. E., G. J. Freeman, et al. (2007). "PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues." *J Immunol* 179(8): 5064-70.
- Kenny, E., D. Mason, et al. (2004). "CD8 alpha is an activation marker for a subset of peripheral CD4 T cells." *Eur J Immunol* 34(5): 1262-71.
- Kern, P., R. E. Hussey, et al. (1999). "Expression, purification, and functional analysis of murine ectodomain fragments of CD8alphaalpha and CD8alphabeta dimers." *J Biol Chem* 274(38): 27237-43.
- Kerry, S. E., J. Buslepp, et al. (2003). "Interplay between TCR affinity and necessity of coreceptor ligation: high-affinity peptide-MHC/TCR interaction overcomes lack of CD8 engagement." *J Immunol* 171(9): 4493-503.
- Kincaid, M. M. and A. A. Cooper (2007). "Misfolded proteins traffic from the endoplasmic reticulum (ER) due to ER export signals." *Mol Biol Cell* 18(2): 455-63.
- Klein, C., N. Philippe, et al. (1994). "Partial albinism with immunodeficiency (Griscelli syndrome)." *J Pediatr* 125(6 Pt 1): 886-95.
- Kojima, Y., A. Kawasaki-Koyanagi, et al. (2002). "Localization of Fas ligand in cytoplasmic granules of CD8+ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells: participation of Fas ligand in granule exocytosis model of cytotoxicity." *Biochem Biophys Res Commun* 296(2): 328-36.

- Koller, B. H., P. Marrack, et al. (1990). "Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells." *Science* 248(4960): 1227-30.
- Konno, A., K. Okada, et al. (2002). "CD8alpha alpha memory effector T cells descend directly from clonally expanded CD8alpha +beta high TCRalpha beta T cells in vivo." *Blood* 100(12): 4090-7.
- Kostova, Z. and D. H. Wolf (2003). "For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection." *EMBO J* 22(10): 2309-17.
- Kuhn, J. R. and M. Poenie (2002). "Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing." *Immunity* 16(1): 111-21.
- Lambolez, F., M. L. Arcangeli, et al. (2006). "The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs." *Nat Immunol* 7(1): 76-82.
- Landman-Parker, J., F. Le Deist, et al. (1993). "Partial engraftment of donor bone marrow cells associated with long-term remission of haemophagocytic lymphohistiocytosis." *Br J Haematol* 85(1): 37-41.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." *Annu Rev Immunol* 23: 225-74.
- Lankat-Buttgereit, B. and R. Tampe (2002). "The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases." *Physiol Rev* 82(1): 187-204.
- Le Deist, F., J. F. Emile, et al. (1996). "Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions." *Lancet* 348(9029): 719-23.
- Lee, M. C., E. A. Miller, et al. (2004). "Bi-directional protein transport between the ER and Golgi." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 87-123.
- Lee, S. P., W. A. Thomas, et al. (1996). "Transporter (TAP)-independent processing of a multiple membrane-spanning protein, the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2." *Eur J Immunol* 26(8): 1875-83.
- Lenardo, M., K. M. Chan, et al. (1999). "Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment." *Annu Rev Immunol* 17: 221-53.
- Lewis, J. M., M. Girardi, et al. (2006). "Selection of the cutaneous intraepithelial gammadelta+ T cell repertoire by a thymic stromal determinant." *Nat Immunol* 7(8): 843-50.
- Li, M., P. Baumeister, et al. (2000). "ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1." *Mol Cell Biol* 20(14): 5096-106.
- Liao, N. S., M. Bix, et al. (1991). "MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity." *Science* 253(5016): 199-202.
- Liu, X. and R. Bosselut (2004). "Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo." *Nat Immunol* 5(3): 280-8.
- Lopatin, U., X. Yao, et al. (2001). "Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression." *Blood* 97(10): 3161-70.

- Lopez, D., R. Garcia-Hoyo, et al. (1994). "Clonal analysis of alloreactive T cell responses against the closely related B*2705 and B*2703 subtypes. Implications for HLA-B27 association to spondyloarthropathy." *J Immunol* 152(11): 5557-71.
- Loza, M. J., L. Zamai, et al. (2002). "Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells." *Blood* 99(4): 1273-81.
- Madakamutil, L. T., U. Christen, et al. (2004). "CD8alpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors." *Science* 304(5670): 590-3.
- Madden, D. R., D. N. Garboczi, et al. (1993). "The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2." *Cell* 75(4): 693-708.
- Magerus-Chatinet, A., M. C. Stolzenberg, et al. (2009). "FAS-L, IL-10, and double-negative CD4-CD8-TCR alpha/beta+ T cells are reliable markers of ALPS associated with FAS loss of function." *Blood*.
- Mancebo, E., M. A. Moreno-Pelayo, et al. (2008). "Gly111Ser mutation in CD8A gene causing CD8 immunodeficiency is found in Spanish Gypsies." *Mol Immunol* 45(2): 479-84.
- Markel, G., H. Mussaffi, et al. (2004). "The mechanisms controlling NK cell autoreactivity in TAP2-deficient patients." *Blood* 103(5): 1770-8.
- Matamoros, N., J. Mila, et al. (2001). "Molecular studies and NK cell function of a new case of TAP2 homozygous human deficiency." *Clin Exp Immunol* 125(2): 274-82.
- McNicol, A. M., G. Bendle, et al. (2007). "CD8alpha/alpha homodimers fail to function as co-receptor for a CD8-dependent TCR." *Eur J Immunol* 37(6): 1634-41.
- Menasche, G., C. H. Ho, et al. (2003). "Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1)." *J Clin Invest* 112(3): 450-6.
- Menasche, G., E. Pastural, et al. (2000). "Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome." *Nat Genet* 25(2): 173-6.
- Mescher, M. F., P. Agarwal, et al. (2007). "Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation." *Semin Immunol* 19(3): 153-61.
- Mescher, M. F., J. M. Curtsinger, et al. (2006). "Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells." *Immunol Rev* 211: 81-92.
- Miosge, L. and R. Zamoyska (2007). "Signalling in T-cell development: is it all location, location, location?" *Curr Opin Immunol* 19(2): 194-9.
- Moebius, U., G. Kober, et al. (1991). "Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations." *Eur J Immunol* 21(8): 1793-800.
- Moins-Teisserenc, H. T., S. D. Gadola, et al. (1999). "Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules." *Lancet* 354(9190): 1598-603.
- Moody, A. M., D. Chui, et al. (2001). "Developmentally regulated glycosylation of the CD8alphabeta coreceptor stalk modulates ligand binding." *Cell* 107(4): 501-12.

- Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." *Science* 267(5203): 1449-56.
- Naito, T., P. Gomez-Del Arco, et al. (2007). "Antagonistic interactions between Ikaros and the chromatin remodeler Mi-2beta determine silencer activity and Cd4 gene expression." *Immunity* 27(5): 723-34.
- Nakayama, K., K. Nakayama, et al. (1994). "Requirement for CD8 beta chain in positive selection of CD8-lineage T cells." *Science* 263(5150): 1131-3.
- Nakayama, K., I. Negishi, et al. (1994). "Requirement for CD8 beta chain in positive selection of CD8-lineage T cells." *Science* 263(5150): 1131-3.
- Norment, A. M. and D. R. Littman (1988). "A second subunit of CD8 is expressed in human T cells." *EMBO J* 7(11): 3433-9.
- Ohtsubo, K. and J. D. Marth (2006). "Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease." *Cell* 126(5): 855-67.
- Oliveira, J. B., N. Bidere, et al. (2007). "NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(21): 8953-8.
- Oliveira, J. B. and S. Gupta (2008). "Disorders of apoptosis: mechanisms for autoimmunity in primary immunodeficiency diseases." *J Clin Immunol* 28 Suppl 1: S20-8.
- Orange, J. S. (2002). "Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection." *Microbes Infect* 4(15): 1545-58.
- Orange, J. S. and Z. K. Ballas (2006). "Natural killer cells in human health and disease." *Clin Immunol* 118(1): 1-10.
- Pai, S. Y., M. L. Truitt, et al. (2003). "Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development." *Immunity* 19(6): 863-75.
- Palade, G. (1975). "Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis." *Science* 189(4206): 867.
- Paliard, X., B. Doe, et al. (2001). "Induction of herpes simplex virus gB-specific cytotoxic T lymphocytes in TAP1-deficient mice by genetic immunization but not HSV infection." *Virology* 282(1): 56-64.
- Pan, Y. T., H. Hori, et al. (1983). "Castanospermine inhibits the processing of the oligosaccharide portion of the influenza viral hemagglutinin." *Biochemistry* 22(16): 3975-84.
- Pang, D. J., A. C. Hayday, et al. (2007). "CD8 Raft localization is induced by its assembly into CD8alpha beta heterodimers, Not CD8alpha alpha homodimers." *J Biol Chem* 282(18): 13884-94.
- Paradela, A., M. Garcia-Peydro, et al. (1998). "The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity." *J Immunol* 161(10): 5481-90.
- Pascale, M. C., N. Malagolini, et al. (1992). "Biosynthesis and oligosaccharide structure of human CD8 glycoprotein expressed in a rat epithelial cell line." *J Biol Chem* 267(14): 9940-7.
- Pastural, E., F. Ersoy, et al. (2000). "Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus." *Genomics* 63(3): 299-306.
- Payne, R., F. M. Brodsky, et al. (1983). ""Bare lymphocytes" without immunodeficiency." *Hum Immunol* 6(4): 219-27.

- Plempner, R. K. and D. H. Wolf (1999). "Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease." *Trends Biochem Sci* 24(7): 266-70.
- Prlic, M., M. A. Williams, et al. (2007). "Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance." *Curr Opin Immunol* 19(3): 315-9.
- "Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular & Cellular Approach". 2nd Edition. Hans D. Ochs, C. I. Edward Smith, Jennifer M. Puck. Oxford University Press, Inc.
- Puck, J. M. and S. E. Straus (2004). "Somatic mutations--not just for cancer anymore." *N Engl J Med* 351(14): 1388-90.
- Pulido, R. and F. Sanchez-Madrid (1989). "Biochemical nature and topographic localization of epitopes defining four distinct CD45 antigen specificities. Conventional CD45, CD45R, 180 kDa (UCHL1) and 220/205/190 kDa." *J Immunol* 143(6): 1930-6.
- Raulet, D. H. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." *Nat Rev Immunol* 3(10): 781-90.
- Raulet, D. H., W. Held, et al. (1997). "Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors." *Immunol Rev* 155: 41-52.
- Raulet, D. H., R. E. Vance, et al. (2001). "Regulation of the natural killer cell receptor repertoire." *Annu Rev Immunol* 19: 291-330.
- Riddle, D. S., P. J. Miller, et al. (2008). "Rescue of cytotoxic function in the CD8alpha knockout mouse by removal of MHC class II." *Eur J Immunol* 38(6): 1511-21.
- Rieux-Laucat, F. (2006). "Inherited and acquired death receptor defects in human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome." *Curr Dir Autoimmun* 9: 18-36.
- Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, et al. (2003). "Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways." *Cell Death Differ* 10(1): 124-33.
- Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, et al. (1995). "Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity." *Science* 268(5215): 1347-9.
- Roesler, J., J. M. Izquierdo, et al. (2005). "Haploinsufficiency, rather than the effect of an excessive production of soluble CD95 (CD95{Delta}TM), is the basis for ALPS Ia in a family with duplicated 3' splice site AG in CD95 intron 5 on one allele." *Blood* 106(5): 1652-9.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 519-29.
- Rossi, C. P., A. McAllister, et al. (1998). "Theiler's virus infection of perforin-deficient mice." *J Virol* 72(5): 4515-9.
- Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, et al. (2006). "How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors." *Annu Rev Immunol* 24: 419-66.
- Sallusto, F., J. Geginat, et al. (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." *Annu Rev Immunol* 22: 745-63.
- Sanal, O., F. Ersoy, et al. (2002). "Griscelli disease: genotype-phenotype correlation in an array of clinical heterogeneity." *J Clin Immunol* 22(4): 237-43.

- Sato, T., S. Ohno, et al. (2005). "Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes." *Immunity* 22(3): 317-28.
- Sawada, S., J. D. Scarborough, et al. (1994). "A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development." *Cell* 77(6): 917-29.
- Scheuner, D., B. Song, et al. (2001). "Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis." *Mol Cell* 7(6): 1165-76.
- Sebzda, E., M. Choi, et al. (1997). "Peptide-induced positive selection of TCR transgenic thymocytes in a coreceptor-independent manner." *Immunity* 6(5): 643-53.
- Sebzda, E., M. Choi, et al. (1997). "Peptide-induced positive selection of TCR transgenic thymocytes in a coreceptor-independent manner." *Immunity* 6(5): 643-53.
- Setoguchi, R., M. Tachibana, et al. (2008). "Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development." *Science* 319(5864): 822-5.
- Shiflett, S. L., J. Kaplan, et al. (2002). "Chediak-Higashi Syndrome: a rare disorder of lysosomes and lysosome related organelles." *Pigment Cell Res* 15(4): 251-7.
- Shore, D. A., L. Teyton, et al. (2006). "Crystal structure of the TCR co-receptor CD8 α in complex with monoclonal antibody YTS 105.18 Fab fragment at 2.88 Å resolution." *J Mol Biol* 358(2): 347-54.
- Singer, A., S. Adoro, et al. (2008). "Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice." *Nat Rev Immunol* 8(10): 788-801.
- Singer, A. and R. Bosselut (2004). "CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision." *Adv Immunol* 83: 91-131.
- Sneller, M. C., J. K. Dale, et al. (2003). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Curr Opin Rheumatol* 15(4): 417-21.
- Sneller, M. C., S. E. Straus, et al. (1992). "A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine *lpr/gld* disease." *J Clin Invest* 90(2): 334-41.
- Sneller, M. C., J. Wang, et al. (1997). "Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis." *Blood* 89(4): 1341-8.
- Spies, T., V. Cerundolo, et al. (1992). "Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer." *Nature* 355(6361): 644-6.
- Spritz, R. A. (1998). "Genetic defects in Chediak-Higashi syndrome and the beige mouse." *J Clin Immunol* 18(2): 97-105.
- Stepp, S. E., R. Dufourcq-Lagelouse, et al. (1999). "Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis." *Science* 286(5446): 1957-9.
- Stern, L. J. and D. C. Wiley (1994). "Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins." *Behring Inst Mitt*(94): 1-10.
- Stinchcombe, J. C., G. Bossi, et al. (2001). "The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges." *Immunity* 15(5): 751-61.

- Stinchcombe, J. C., G. Bossi, et al. (2001). "The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges." *Immunity* 15(5): 751-61.
- Stinchcombe, J. C. and G. M. Griffiths (1999). "Regulated secretion from hemopoietic cells." *J Cell Biol* 147(1): 1-6.
- Stros, M., D. Launholt, et al. (2007). "The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins." *Cell Mol Life Sci* 64(19-20): 2590-606.
- Sugiyama, Y., H. Maeda, et al. (1986). "Progressive sinobronchiectasis associated with the "bare lymphocyte syndrome" in an adult." *Chest* 89(3): 398-401.
- Sullivan, K. E., C. A. Delaat, et al. (1998). "Defective natural killer cell function in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and in first degree relatives." *Pediatr Res* 44(4): 465-8.
- Sun, G., X. Liu, et al. (2005). "The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection." *Nat Immunol* 6(4): 373-81.
- Sun, T., Y. Gao, et al. (2007). "A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter is associated with susceptibility to multiple cancers." *Nat Genet* 39(5): 605-13.
- Taniuchi, I., M. Osato, et al. (2002). "Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development." *Cell* 111(5): 621-33.
- Tchernev, V. T., T. A. Mansfield, et al. (2002). "The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins." *Mol Med* 8(1): 56-64.
- Teisserenc, H., W. Schmitt, et al. (1997). "A case of primary immunodeficiency due to a defect of the major histocompatibility gene complex class I processing and presentation pathway." *Immunol Lett* 57(1-3): 183-7.
- Termine, D. J., K. W. Moremen, et al. (2009). "The mammalian UPR boosts glycoprotein ERAD by suppressing the proteolytic downregulation of ER mannosidase I." *J Cell Sci* 122(Pt 7): 976-84.
- Tham, E. L. and M. F. Mescher (2001). "Signaling alterations in activation-induced nonresponsive CD8 T cells." *J Immunol* 167(4): 2040-8.
- Theofilopoulos, A. N., R. S. Balderas, et al. (1981). "Influence of thymic genotype on the systemic lupus erythematosus-like disease and T cell proliferation of MRL/Mp-lpr/lpr mice." *J Exp Med* 153(6): 1405-14.
- Tomasello, E., M. Blery, et al. (2000). "Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells." *Semin Immunol* 12(2): 139-47.
- Tomiyama, H., H. Takata, et al. (2004). "Phenotypic classification of human CD8+ T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function." *Eur J Immunol* 34(4): 999-1010.
- Urban, J. A. and S. Winandy (2004). "Ikaros null mice display defects in T cell selection and CD4 versus CD8 lineage decisions." *J Immunol* 173(7): 4470-8.
- Valenzuela, J. O., C. D. Hammerbeck, et al. (2005). "Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells." *J Immunol* 174(2): 600-4.

- Valiante, N. M., K. Lienert, et al. (1997). "Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution." *Immunol Rev* 155: 155-64.
- Van Kaer, L., P. G. Ashton-Rickardt, et al. (1992). "TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells." *Cell* 71(7): 1205-14.
- Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, et al. (1998). "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally." *Immunity* 9(2): 267-76.
- Vashist, S. and D. T. Ng (2004). "Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control." *J Cell Biol* 165(1): 41-52.
- Veillette, A., M. A. Bookman, et al. (1988). "The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck." *Cell* 55(2): 301-8.
- Veillette, A., J. C. Zuniga-Pflucker, et al. (1989). "Engagement of CD4 and CD8 expressed on immature thymocytes induces activation of intracellular tyrosine phosphorylation pathways." *J Exp Med* 170(5): 1671-80.
- Villa-Forte, A., H. de la Salle, et al. (2008). "HLA class I deficiency syndrome mimicking Wegener's granulomatosis." *Arthritis Rheum* 58(8): 2579-82.
- Vitale, M., J. Zimmer, et al. (2002). "Analysis of natural killer cells in TAP2-deficient patients: expression of functional triggering receptors and evidence for the existence of inhibitory receptor(s) that prevent lysis of normal autologous cells." *Blood* 99(5): 1723-9.
- Vogt, G., J. Bustamante, et al. (2008). "Complementation of a pathogenic IFNGR2 misfolding mutation with modifiers of N-glycosylation." *J Exp Med* 205(8): 1729-37.
- Vogt, G., A. Chappier, et al. (2005). "Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations." *Nat Genet* 37(7): 692-700.
- Wang, J., L. Zheng, et al. (1999). "Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II." *Cell* 98(1): 47-58.
- Ward, D. M., S. L. Shiflett, et al. (2002). "Chediak-Higashi syndrome: a clinical and molecular view of a rare lysosomal storage disorder." *Curr Mol Med* 2(5): 469-77.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, et al. (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." *Nature* 356(6367): 314-7.
- Weng, S. and R. G. Spiro (1993). "Demonstration that a kifunensine-resistant alpha-mannosidase with a unique processing action on N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells." *J Biol Chem* 268(34): 25656-63.
- Weng, S. and R. G. Spiro (1996). "Evaluation of the early processing routes of N-linked oligosaccharides of glycoproteins through the characterization of Man8GlcNAc2 isomers: evidence that endomannosidase functions in vivo in the absence of a glucosidase blockade." *Glycobiology* 6(8): 861-8.
- Wherry, E. J., V. Teichgraber, et al. (2003). "Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets." *Nat Immunol* 4(3): 225-34.

- Wherry, E. J., V. Teichgraber, et al. (2003). "Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets." *Nat Immunol* 4(3): 225-34.
- Wiest, D. L., L. Yuan, et al. (1993). "Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules." *J Exp Med* 178(5): 1701-12.
- Williams, M. A. and M. J. Bevan (2007). "Effector and memory CTL differentiation." *Annu Rev Immunol* 25: 171-92.
- Wilson, S. M., R. Yip, et al. (2000). "A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashken mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7933-8.
- Witte, T., R. Spoerl, et al. (1999). "The CD8beta ectodomain contributes to the augmented coreceptor function of CD8alpha-beta heterodimers relative to CD8alpha-alpha homodimers." *Cell Immunol* 191(2): 90-6.
- Wong, J. S., X. Wang, et al. (2003). "Stalk region of beta-chain enhances the coreceptor function of CD8." *J Immunol* 171(2): 867-74.
- Wu, J., J. Wilson, et al. (1996). "Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease." *J Clin Invest* 98(5): 1107-13.
- Wu, Y., D. J. Termine, et al. (2007). "Human endoplasmic reticulum mannosidase I is subject to regulated proteolysis." *J Biol Chem* 282(7): 4841-9.
- Yabe, T., S. Kawamura, et al. (2002). "A subject with a novel type I bare lymphocyte syndrome has tapasin deficiency due to deletion of 4 exons by Alu-mediated recombination." *Blood* 100(4): 1496-8.
- Yamasaki, S., E. Ishikawa, et al. (2006). "Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development." *Nat Immunol* 7(1): 67-75.
- Yasutomo, K., C. Doyle, et al. (2000). "The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate." *Nature* 404(6777): 506-10.
- Zhu, S., A. P. Hsu, et al. (2006). "Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Hum Genet* 119(3): 284-94.
- Zimmer, J., E. Andres, et al. (2005). "Clinical and immunological aspects of HLA class I deficiency." *QJM* 98(10): 719-27.
- Zimmer, J., L. Donato, et al. (1998). "Activity and phenotype of natural killer cells in peptide transporter (TAP)-deficient patients (type I bare lymphocyte syndrome)." *J Exp Med* 187(1): 117-22.
- Zingoni, A., T. Sornasse, et al. (2004). "Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions." *J Immunol* 173(6): 3716-24.
- zur Stadt, U., S. Schmidt, et al. (2005). "Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11." *Hum Mol Genet* 14(6): 827-34.